Untersuchungen zur Struktur des Pflanzenferredoxins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dieter Josef
aus Codlea/Rumänien

1969

Untersuchungen zur Struktur des Pflanzenferredoxins

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Dieter J o s e f

aus

Codlea/Rumänien

1969

Tag der mündlichen Prüfung: 22.Mai 1969

Dekan:..... Prof. Dr. Adolf Seilacher

1. Berichterstatter:..... Prof. Dr. Ernst Bayer

2. Berichterstatter:..... Prof. Dr. Eugen Müller

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1967
bis Februar 1969 unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. E. Bayer
im Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. Bayer,
danke ich sehr herzlich für seine Ratschläge und großzügige
Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Hanspaul Hagenmaier möchte ich an dieser Stelle
für viele wertvolle Ratschläge herzlich danken.

In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

Apofd	Apoferredoxin
CMC	Carboxymethyl-Cystein
DP	α, α '- Dipyridyl
Fd	Ferredoxin
MET	2-Mercaptoäthanol
Mod	Modulation
PCMB	p-Chlor-mercuribenzoat
PCMS	p-Chlor-mercuribenzolsulfonat
SL	Signal level (Amplitude)
SR	Sweep range (Vorschub)
TCA	Trichloressigsäure
TPP	Triphenylphosphin
TPPS	Triphenylphosphinsulfid

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung und Problemstellung 1

B. Allgemeiner Teil 3

I. Pflanzenferredoxin 3

a) Isolierung aus Spinat 3
b) Apoferredoxine 6
c) Resynthese des Ferredoxins 8
d) Eigenschaften 11

1. Eisenbestimmung 11
2. Bestimmung des "labilen Schwefels" 11
3. Enzymatische Aktivität 11

e) ESR-Spektroskopische Untersuchungen 13

II. Aminosäurezusammensetzung und Sequenz 15

III. Molekulargewichtsbestimmungen 18

a) an Sephadex G-50 18
b) mit der Ultrazentrifuge 19

IV. Redoxsysteme des Ferredoxins 20

a) Eisen-System 20
b) Schwefel-System 21
c) Cystein-System 23
d) Persulfid-System 24

V. Untersuchung an ^{35}S-Ferredoxin 24

VI. Simultanbestimmung des Eisens, des "labilen Schwefels" und der Cystein-Mercaptogruppen 29

a) Abbau mit α,α'-Dipyridyl 29
b) Abbau mit Trichloressigsäure 30
c) Abbau mit Tiron 30
d) Abbau mit p-Chlor-mercuribenzoat 31
e) Abbau mit Triphenylphosphin 32

VII. Strukturmodell des Aktivzentrums 33

C. Experimenteller Teil 35

I. Isolierung des Ferredoxins aus Spinat 35

II. Abbaureaktionen des Ferredoxins 38

a) mit α,α'-Dipyridyl 38
b) mit Trichloressigsäure 39
c) mit p-Chlor-mercuribenzoat 40
d) mit Tiron 41
e) mit Triphenylphosphin 41

III. Resynthesen des Ferredoxins 41

a) mit 2-Mercaptoäthanol, Natriumsulfid und Eisen(II)-ammoniumsulfat 41

1. aus DP-Apoferredoxin 41
2. aus PCMB-Apoferredoxin 42
3. aus TCA-Apoferredoxin 42

b) mit einem Eisen-Persulfid-Komplex 43

IV. Eisenbestimmungen 44

a) mit α,α'-Dipyridyl als Eisen(II) 44
b) mit Tiron als Eisen(III) 44

1. nach Behandlung mit p-Chlor-mercuribenzoat 44
2. nach Behandlung mit 1 N NaOH bei pH 12 45

V. Bestimmungen des "labilen Schwefels" 45

a) als S^{2-} durch die Methylenblau-Reaktion 45
b) aus der Radioaktivität von ^{35}S-Ferredoxin 46
c) als S^{o} mit Triphenylphosphin 47

1. durch kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie 47
2. aus der Radioaktivität des Triphenylphosphinsulfids 47

VI. Bestimmung der freien Cystein-Mercaptogruppen 47

a) durch Carboxymethylierung mit Jodessigsäure-2-^{14}C 47
b) durch Aminosäureanalysen des CMC-Proteins 48
c) durch PCMB-Titration 49

VII. Gleichzeitige Bestimmung von Eisen, "labilem Schwefel" und freien Cystein-Mercaptogruppen 50

a) bei der DP-Reaktion 50
b) bei der TCA-Reaktion 50
c) bei der Tiron-Reaktion 51
d) bei der TPP-Reaktion 51

VIII. Enzymatische Bestimmung der Aktivität 51

D. Zusammenfassung 53

E. Literaturverzeichnis 55

A. Einleitung und Problemstellung

1962 isolierten Mortenson, Valentine und Carnahan (1) aus Clostridium pasteurianum ein eisenhaltiges, aber häm- und flavinfreies Protein, das bei der biologischen Stickstoffassimilation der Bakterien als Elektronenüberträger (E_o' = -0,417 V) wirkt. Auf Grund dieser Eigenschaften erhielt das Protein den Namen Ferredoxin. Chemisch charakterisiert wird das Bakterienferredoxin durch seinen Gehalt von 6 g-Atomen Eisen und 6 g-Atomen "labilen Schwefel"[+)] bei einem Molekulargewicht von rund 6 000 (2).

1966 wurde von Bachofen und Arnon (3) aus Chromatium, einem photosynthetischen Bakterium, ein Ferredoxin mit 4 g-Atomen Eisen und 4 g-Atomen "labilem Schwefel" und einem Molekulargewicht von 9 000 (4) isoliert.

Eisenhaltige Proteine in Algen und Pflanzen sind schon länger bekannt. Wie das Bakterienferredoxin bei der Stickstoffassimilation wirken diese bei der Photosynthese als Elektronenüberträger (E_o' = -0,420 V)(5). Die Pflanzenferredoxine enthalten alle nur 2 g-Atome Eisen und 2 g-Atome "labilen Schwefel" bei einem Molekulargewicht von rund 12 000 (5,6,7). Ferredoxine vom Pflanzenferredoxintyp sind auch in tierischen Organen und bestimmten Bakterienkulturen gefunden und unter den Namen Adrenodoxin (8) und Putidaredoxin (9) beschrieben worden.

Im weiteren Sinne gehören zu den Ferredoxinen auch die Nichthäm-Eisenproteine wie Xanthinoxydase oder Succinatdehydrogenase, die zwar weitere Metalle und prostetische Gruppen enthalten, aber auch eine Äquivalenz von Eisen und "labilem Schwefel" aufweisen.

Proteine vom Ferredoxintyp nehmen also eine Schlüsselstellung bei fundamentalen biochemischen Prozessen ein. Die Aufklärung der Funktion, des chemischen Aufbaus und der Struktur der Ferredoxine ist deshalb von größter Bedeutung.

[+)] Definition des "labilen Schwefels": Der Schwefel, der sich bei der Direktbestimmung nach Fogo und Popowsky (10) nach Behandlung mit alkalischer Zinkacetatlösung als Methylenblau nachweisen läßt.

Für eine chemische Untersuchung bietet sich das Spinatferredoxin an. Es gehört zu dem am einfachsten gebauten Ferredoxintyp, ist relativ einfach zu isolieren (11,12) und die Aminosäuresequenz ist genau bekannt (7).

In dieser Arbeit sollte deshalb das Aktivzentrum des Spinatferredoxins untersucht werden, besonders die Wertigkeit des Eisens, die Herkunft des "labilen Schwefels" und deren Bindung an das Protein.

B. Allgemeiner Teil

I. Pflanzenferredoxin

a) Isolierung aus Spinat

Die Isolierung des Ferredoxins[+)] ist von verschiedenen Arbeitskreisen untersucht und beschrieben worden (13,14,15,16). Alle Verfahren sind aber recht langwierig und wegen der Zersetzlichkeit des Ferredoxins zur Isolierung größerer Mengen nicht gut geeignet. Es wurde deshalb ein neues Verfahren entwickelt, mit dem es gelang, innerhalb von zwei Tagen bis zu 300 mg reines Ferredoxin zu isolieren.

Im experimentellen Teil und in Tabelle 1 ist die Isolierung im einzelnen beschrieben, wobei folgende wesentliche Variationen gegenüber früheren Methoden eingeführt wurden: Auf das zeitraubende Entstielen und Homogenisieren des Spinats wurde ganz verzichtet. Die in Tris-HCl-Puffer gewaschenen Pflanzen wurden sofort bei 6 000 Upm entsaftet. Aus dem Rohsaft wurde der größte Teil der Begleitstoffe nach San Pietro und Lang (13) mit Aceton gefällt und durch Zentrifugieren abgetrennt. An Stelle der Fällung des Ferredoxins durch weitere Acetonzugabe wurde das Ferredoxin durch Adsorption an DEAE-Cellulose abgetrennt. Von der Cellulose wurde das Ferredoxin mit 1 M Acetat-Puffer in Anlehnung an die Vorschrift von Hill und Bendall (16) eluiert. Auf das übliche Entsalzen durch Dialyse wurde wegen der dabei auftretenden teilweisen Denaturierung verzichtet. Statt dessen wurde das Eluat mit Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt, das Ferredoxin an einer DEAE-Cellulosesäule gesammelt, mit 1 M Acetat-Puffer eluiert und durch Chromatographie an Sephadex G-75 und G-50 gereinigt. Das Lichtabsorptionsspektrum des so isolierten Ferredoxins ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Die Reinheit des Ferredoxins wurde durch Disk-Elektrophorese (Abb. 2a) geprüft. Das Extinktionsverhältnis $E_{420\ nm}/E_{276\ nm}$

+) Im folgenden Text wird Ferredoxin in der Bedeutung von Pflanzenferredoxin aus Spinat gebraucht.

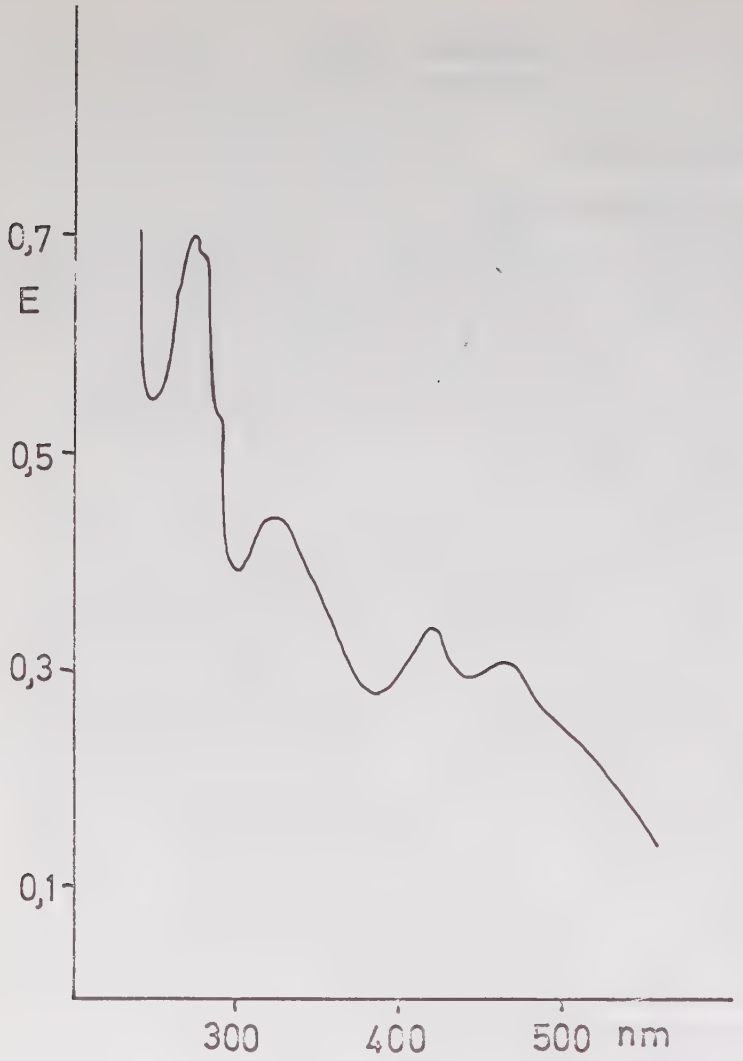
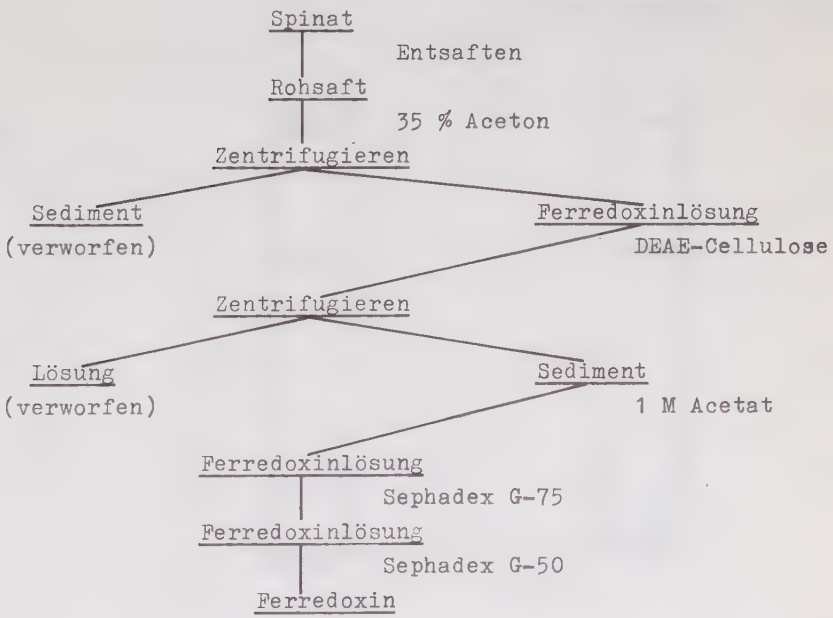


Abb. 1: Absorptionsspektrum des nativen Ferredoxins (0,49 mg/ml) in 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4, gemessen mit einem Zeiss PMQ II Spektrometer, Schichtdicke: 1 cm.
Die Konzentration wurde durch Trockeneinwaage bestimmt.

lag bei den verschiedenen Aufarbeitungen gewöhnlich zwischen 0,42 und 0,46. Das Ferredoxin ist in 0,2 M Acetat-Puffer bei -30°C monatelang ohne merkliche Denaturierung haltbar, läßt sich an einer kurzen Sephadex G-25 Säule entsalzen und ist gefriergetrocknet auch bei Zimmertemperatur mehrere Tage stabil. Der molare Extinktionskoeffizient bei 420 nm von so hergestelltem Ferredoxin, das zusätzlich bei 0,1 Torr über P_2O_5 getrocknet worden war, wurde zu $8{,}8 \cdot 10^3$ bestimmt. Tagawa und Arnon (17) fanden auf Grund des Eisengehaltes des Ferredoxins einen um 10 % höheren Extinktionskoeffizienten. Die beiden Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenzen überein.

Tabelle 1: Isolierung des Ferredoxins



b) Apoferredoxine

Die schonende Abspaltung des Eisens und des "labilen Schwefels" aus dem nativen Ferredoxin gelang auf drei verschiedenen Wegen:

1. mit p-Chlor-mercuribenzonat (PCMB) nach (18),
2. mit α,α'-Dipyridyl (DP) nach (19) und
3. mit Trichloressigsäure (TCA) nach (20).

Bei allen drei Methoden wurden resynthesefähige Apoferredoxine erhalten, die sich durch Chromatographie an Sephadex G-25 oder G-50 reinigen und entsalzen ließen. Die Reinheit wurde beim DP-Apoferredoxin durch Disk-Elektrophorese geprüft (Abb. 2b). Der molare Extinktionskoeffizient bei 276 nm wurde wie beim nativen Ferredoxin bestimmt. Beim DP- und TCA-Apoferredoxin betrug er $1{,}56 \cdot 10^4$; beim PCMB-Apoferredoxin $1{,}71 \cdot 10^4$. In Abb. 3 sind die Lichtabsorptionsspektren der drei Apoferredoxine wiedergegeben.

Abb. 2a:

Abb. 2b:

Disk-Elektrophorese des nativen Ferredoxins (a) und des DP-Apoferredoxins (b).

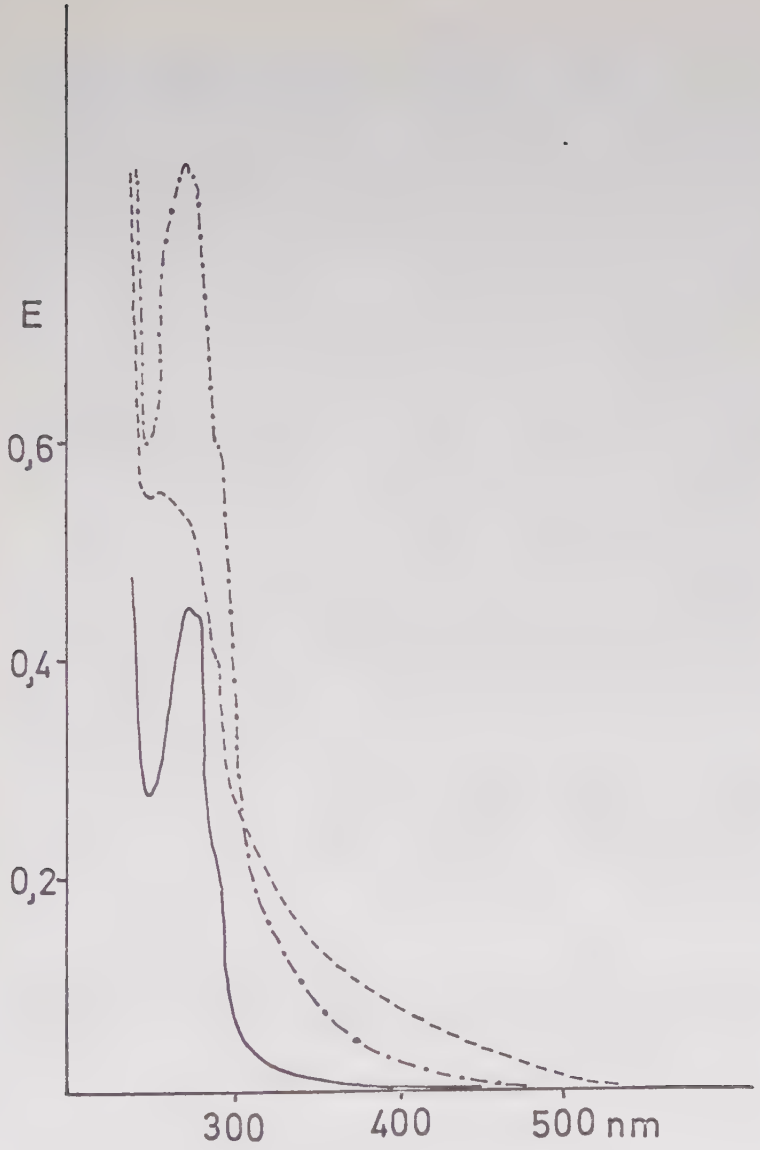


Abb. 3: Lichtabsorptionsspektren:
PCMB-Apoferredoxin (0,39 mg/ml) (--------)
DP-Apoferredoxin (0,31 mg/ml) (————)
TCA-Apoferredoxin (0,68 mg/ml) (-.-.-.-.)
in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8, gemessen mit einem Zeiss PMQ II Spektrometer, Schichtdicke: 1 cm.

c) Resynthese des Ferredoxins

Aus allen drei vorher beschriebenen Apoferredoxinen ließ sich Ferredoxin resynthetisieren (2,6) (Abb. 4). Zur Resynthese ist ein instabiler Mercapto-Eisen-Schwefel-Komplex erforderlich. Die Mercaptoverbindung kann dabei 2-Mercaptoäthanol (MET), Dithioerythrit, Cysteinmethylester oder Cysteamin sein. Unbedingt notwendig sind ferner Sulfid- und Eisen(II)-Ionen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Resynthesebedingungen

Reaktionslösung	Ausbeute in %
DP-Apofd + MET + Na_2S + Fe^{2+}	34
DP-Apofd + MET + Fe^{2+}	5
DP-Apofd + MET(dest.) + Fe^{2+}	0
DP-Apofd + Na_2S + Fe^{2+}	0
[+]DP-Apofd(red.) + MET + Na_2S + Fe^{2+}	0
DP-Apofd + Eisen-Persulfid-Komplex	45
PCMB-Apofd + MET + Na_2S + Fe^{2+}	12
[++]TCA-Apofd + MET + Na_2S + Fe^{2+}	90
[+++]TCA-Apofd + MET + Na_2S + Fe^{2+}	50
[++++]TCA-Apofd (CMC) + MET + Na_2S + Fe^{2+}	0

[+] Reduziert mit Dithioerythrit oder MET und über Sephadex G-25 gereinigt. Erhalten wurde ein eisenhaltiges Produkt, dessen Absorptionsspektrum aber nicht dem Ferredoxin entsprach.

[++] Gefällt mit 10 prozentiger TCA, nicht gereinigt.

[+++] Entsalzt über Sephadex G-25.

[++++] Carboxymethyliert am Cystein mit Jodessigsäure.

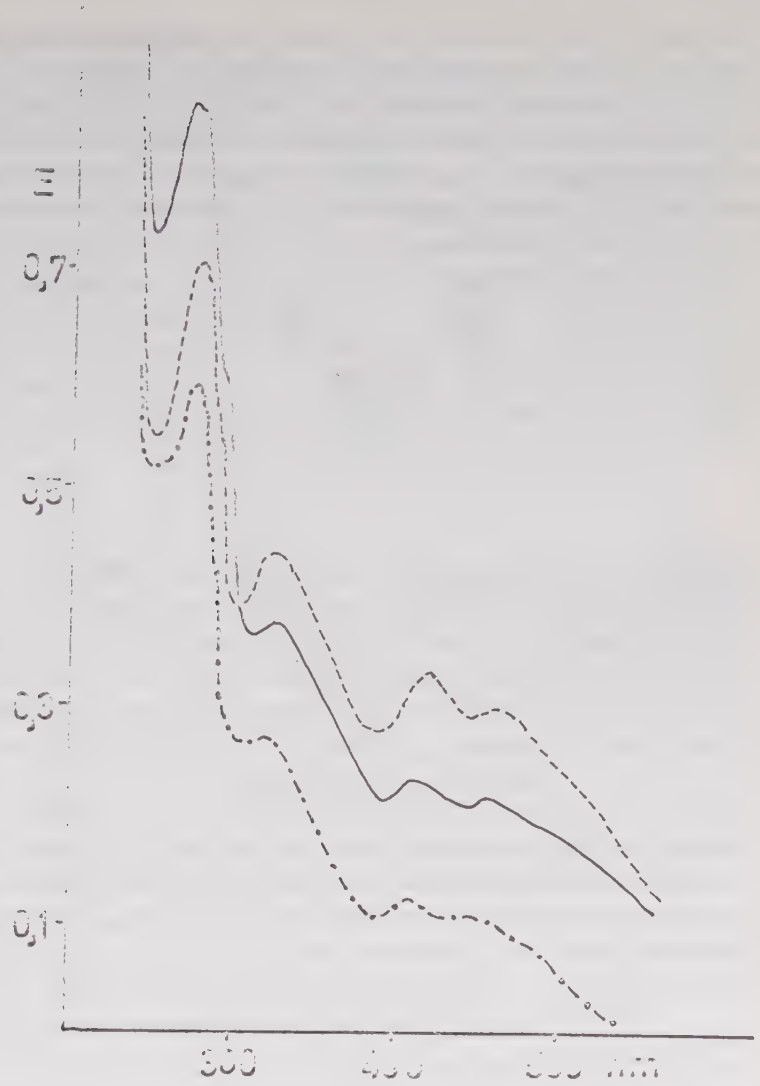
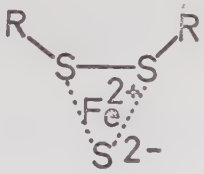


Abb. 4: Lichtabsorptionsspektren der resynth. Ferredoxine:

aus PCMB-Apofd (0,16 mg/ml) (-.-.-.-.-)
aus DP-Apofd (0,34 mg/ml) (————————)
aus TCA-Apofd (0,42 mg/ml) (– – – – – – – –)

in 1 M Acetat-Puffer pH 7,4, gemessen mit einem Zeiss PMQ II Spektrometer, Schichtdicke 1 cm.
Die Konzentrationen wurden aus der Extinktion bei 420 nm bestimmt.

Zur Resynthese kann auch ein vorher hergestellter Cysteamin-Eisen-Schwefel-Komplex (Persulfid-Komplex) verwendet werden (2). Die Resynthese verläuft auf diese Weise besonders gut, da keine störenden Nebenreaktionen auftreten. Der Komplex wurde von Eckstein (21) auf sieben verschiedenen Wegen dargestellt und eingehend untersucht. Die Ergebnisse sprechen für folgende mesomere Struktur:



Wahrscheinlich verläuft die Resynthese des Ferredoxins über diesen Komplex als Zwischenstufe. Eine vorhergehende Reduktion der Disulfidbrücken des Apoferredoxins durch die Mercaptoverbindung erscheint nicht wahrscheinlich, was sich aus folgendem Experiment ergibt: Die Cystein-Mercaptogruppen des DP-Apoferredoxins wurden mit nicht markierter Jodessigsäure nach der Methode von Canfield und Anfinsen (22) blockiert. Bei der anschließenden Aminosäureanalyse wurden 1,5 Mol CM-Cystein pro Mol Protein gefunden. Nach der Behandlung des CMC-Apoferredoxins mit MET unter den Bedingungen der Resynthese konnten durch Umsetzung mit Jodessigsäure-2-^{14}C nur 0,06 Mol zusätzliche CM-Cystein nachgewiesen werden.

Die besten Resynthesebedingungen ergeben sich aus Tabelle 2. TCA- und DP-Apoferredoxin sind nach Reinigung über Sephadex gleich gut zur Resynthese geeignet. TCA-Apoferredoxin ist aber einfacher und schneller herzustellen. Eine Reinigung erübrigt sich außerdem, da es als Niederschlag anfällt. Günstig ist ferner, daß auf diese Weise eine Oxidation ausgeschlossen wird, wie sie bei der Säulenchromatographie auftritt.

d) Eigenschaften

1. Eisenbestimmung

Über den Eisengehalt des Ferredoxins gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. So werden ein (23), zwei (2,17,24), vier (25) und sechs (26) g-Atome Eisen pro Mol Ferredoxin angegeben. Deshalb wurde das Eisen nochmals nach der Methode von Feigl und Hamburg (27,28) mit α, α'-Dipyridyl (DP) bestimmt, entweder nach Veraschen oder durch direkte Zugabe von DP zur Proteinlösung. Sowohl im nativen als auch im resynthetisierten Ferredoxin wurden 2 g-Atome Eisen pro Mol Ferredoxin gefunden. Die Apoferredoxine enthielten nur Spuren von Eisen (Tabelle 3).

2. Bestimmung des "labilen Schwefels"

Der "labile Schwefel" wurde nach Fogo und Popowsky (10) direkt in der Proteinlösung bestimmt. In Übereinstimmung zu Arnon (5) wurden sowohl im nativen als auch im resynthetisierten Ferredoxin 2 g-Atome "labiler Schwefel" gefunden. Die Apoferredoxine enthielten keinen auf diese Weise nachweisbaren "labilen Schwefel" (Tabelle 3).

3. Enzymatische Aktivität

Das Ferredoxin wirkt bei der Photosynthese der Pflanzen als Einelektronenüberträger (17,29). Die enzymatische Aktivität des nativen und des resynthetisierten Ferredoxins und des DP-Apoferredoxins wurden mit isolierten Chloroplasten getestet[+]. Der Sauerstoff wurde dabei manometrisch, das gebildete NADPH photometrisch bestimmt (Tabelle 3).

[+] Herrn Professor A. Trebst, Göttingen, danke ich herzlich für die Ausführung der Bestimmung.

	Ausbeute in %	E_{420}/E_{276}	µMol NADPH pro mg	g-Atome Fe pro Mol	g-Atome "lab.S" pro Mol
natives Ferredoxin	--	0,47	51,2	2,1	1,9
DP-Apofd- + MET + Na_2S + Fe^{2+} a)	34	0,33	49,2	2,2	2,1
DP-Apofd + Eisen-Persulfid-Komplex a)	45	0,29	n.b.	2,3	2,1
DP-Apofd c)	55	0,06	0	0,1	0,0
PCMB-Apofd + MET + Na_2S + Fe^{2+} a)	12	0,21	n.b.	2,4	1,8
PCMB-Apofd b+d)	60	0,07	n.b.	0,2	0,0
TCA-Apofd + MET + Na_2S + Fe^{2+} a)	90	0,33	n.b.	2,2	2,4
TCA-Apofd + MET + Na_2S + Fe^{2+} b)	50	0,44	n.b.	2,1	2,1
TCA-Apofd b)	82	0,03	n.b.	0,1	0,0

Tabelle 3: Eigenschaften von nativem Ferredoxin, Apoferredoxinen und resynthetisierten Ferredoxinen.

a) Gereinigt über DEAE-Cellulose
b) Gereinigt über Sephadex G-50
c) Gereinigt über Sephadex G-25
d) Dargestellt mit Tiron und PCMB
n.b. = nicht bestimmt

e) ESR-Spektroskopische Untersuchungen

Bei Untersuchungen an Mitochondrien fanden Beinert und Sands (30) im ESR-Spektrum bei tiefen Temperaturen einen g-Faktor von 1,94. Dieses Signal ist typisch für alle reduzierten Nichthäm-Eisenproteine. Beim Spinatferredoxin wurde es 1966 von Palmer und Sands (31) und von Hall, Gibson und Whatley (32) gefunden. Das hier dargestellte native und resynthetisierte Ferredoxin gaben mit Dithionit reduziert ebenfalls das 1,94-Signal (2,6). Das ESR-Spektrum zeigt eine symmetrische, aber keine axiale Struktur (Abb. 5). Das von Hall et al. (32) gefundene Signal des nicht reduzierten Ferredoxins bei g = 4,27 wurde ebenfalls beobachtet, muß aber auf Grund seiner geringen Intensität unspezifischem Eisen(III) zugeordnet werden.

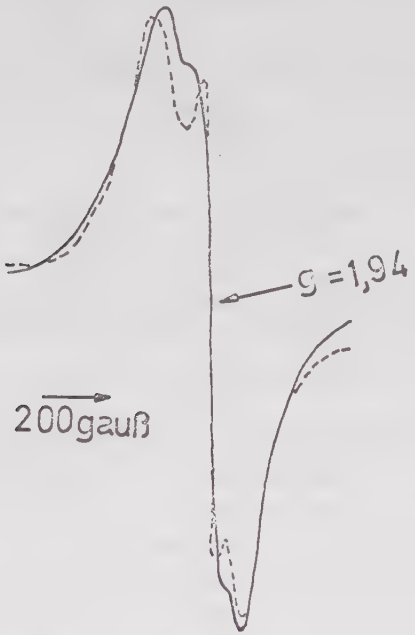


Abb. 5: ESR-Spektrum des reduzierten Ferredoxins bei -180°C.
natives red. Ferredoxin (12 mg/ml) (————)
Mod 250, SL 1 000, SR 250 Gauß / min.
resynth. red. Ferredoxin (4,86 mg/ml) (- - - - -)
Mod 1 600, SL 1 000, SR 250 Gauß / min.
g-Faktoren: g_1 = 2,03, g_2 = 1,94, g_3 = 1,89.

In Abb. 6 ist die charakteristische Temperaturabhängigkeit des 1,94-Signal wiedergegeben (33). Es verbreitert sich stark bei höheren Temperaturen und ist ab -110°C nicht mehr nachweisbar. Die starke Temperaturabhängigkeit spricht für eine Eisen-Eisen-Wechselwirkung.

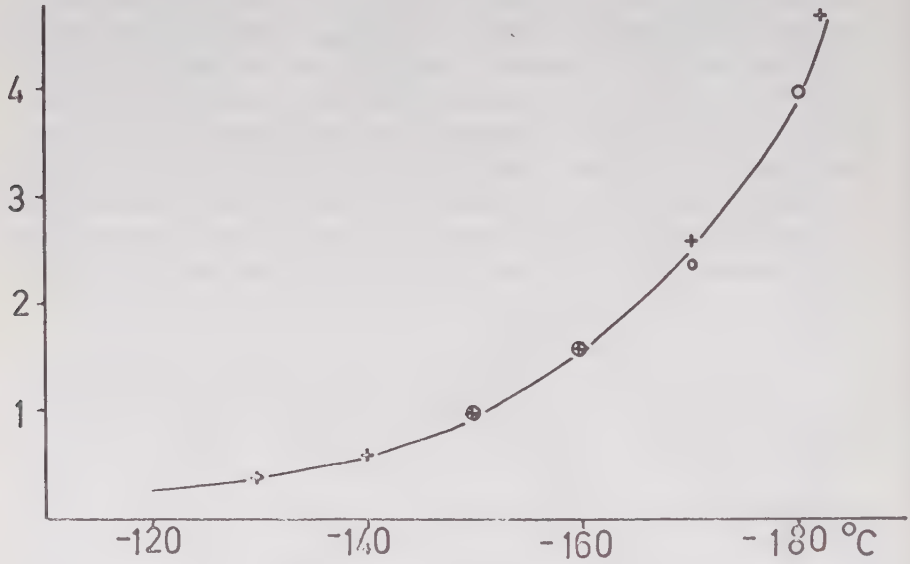


Abb. 6: Temperaturabhängigkeit des 1,94-Signal des nativen (+ + +) und des resynthetisierten reduzierten (o o o) Ferredoxins.
Ordinate: relative Absorption, Bezugswert: -150°C.

Shetna, Wilton, Hansen und Beinert (34) und Palmer (35) konnten durch Substitution des Eisens durch ^{57}Fe die bei einer positiven Spindichte geforderte Verbreiterung der ESR-Absorption nachweisen, und damit die Beteiligung des Eisens sicherstellen. Die Beteiligung des "labilen Schwefels" wurde durch Einbau von ^{33}S bewiesen (36,37). Da auch die dargestellten Apoferredoxine keine charakteristische ESR-Absorption aufweisen (6), muß ein Eisen-Schwefel-System das 1,94-Signal hervorrufen.

Den Herren Dr. A. Röder und P. Krauss danke ich für die Aufnahme und Diskussion der Sprektren.

II. Aminosäurezusammensetzung und Sequenz

Aminosäureanalysen liegen von Fry und San Pietro (18) und von Matsubara, Sasaki und Chain (7) vor. Matsubara et al. klärten gleichzeitig auch die Sequenz auf. Die eigenen Werte stimmten im allgemeinen sehr gut mit der angegebenen Sequenz überein. Unterschiede ergaben sich nur bei der Glutaminsäure (15 statt 13) und Glycin (7 statt 6). Die gleichen Ergebnisse wurden auch von Matsubara et al. (7) bei der direkten Aminosäureanalyse erhalten. Ebenfalls wurde stets Methionin in Spuren gefunden, was für einen teilweisen Austausch einer Aminosäure in der Sequenz spricht. Identisch ist die Aminosäureanalyse des Ferredoxins und des Apoferredoxins (Tabelle 4).

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung

			eigene Werte[+]	
Aminosäure	(18)	(7)	Fd	Apofd
Lysin	4	4	4,0	n.b.
Histidin	1	1	1,1	n.b.
Arginin	1	1	1,7	n.b.
Asparaginsäure	12	13	13,2	13,3
Threonin	8	8	7,2	7,8
Serin	6-7	7	6,9	6,8
Glutaminsäure	13-15	13	14,3	15,0
Prolin	4	4	3,8	3,6
Glycin	7	6	6,8	7,1
Alanin	9	9	9,1[++]	9,0[++]
Cystein	6	5	3,8	4,0
Valin	7-8	7	6,6	7,1
Methionin	1	0	0,4	0,6
Isoleucin	4	4	3,6	3,8
Leucin	7	8	7,8	7,5
Tyrosin	4	4	3,7	3,2
Phenylalanin	2	2	2,0	1,8
Tryptophan	1	1	n.b.	n.b.

[+] nicht auf null extrapoliert.

[++] als Cysteinsäure, nach Oxidation mit Perameisensäure.

n.b. = nicht bestimmt.

Matsubara, Sasaki und Chain (7) ermittelten durch enzymatische Hydrolysen mit Trypsin, α-Chymotrypsin und Thermolysin folgende Sequenz:

1 10
NH_2-Ala-Ala-Tyr-Lys-Val-Thr-Leu-Val -Thr-Pro-Thr-Gly-
20
Asn-Val-Glu-Phe-Gln-Cys-Pro-Asp-Asp-Val-Tyr-Ile-Leu-
30
Asp-Ala-Ala-Glu-Glu-Glu-Gly-Ile -Asp-Leu-Pro-Tyr-Ser-
40 50
Cys-Arg-Ala-Gly-Ser-Cys-Ser-Ser-Cys-Ala-Gly-Lys-Leu-
60
Lys-Thr-Gly-Ser-Leu-Asn-Gln-Asp-Asp-Gln-Ser-Phe-Leu-
70
Asp-Asp-Asp-Gln-Ile-Asp-Glu-Gly-Trp-Val-Leu-Thr-Cys-
80 90
Ala-Ala-Tyr-Pro-Val-Ser-Asp-Val-Thr-Ile-Glu-Thr-His-
97
Lys-Glu-Glu-Glu-Leu-Thr-Ala-COOH

Spinatferredoxin enthält im Gegensatz zum Alfalfaferredoxin (38) nur fünf Cysteinreste, die sich zusammen mit dem "labilen Schwefel" mit PCMB zum Teil titrieren lassen (Abb. 7). Dabei wird aber das Aktivzentrum zerstört. Im Gegensatz dazu reagieren die Cysteine im nativen Ferredoxin nicht mit Jodessigsäure, wie durch Umsetzung mit Jodessigsäure-2-^{14}C nach Canfield und Anfinsen (22) und anschließende Flüssigkeitsszintillationsmessungen nach Bray (39) bewiesen wurde. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß das Aktivzentrum über die Mercaptogruppen des Cysteins an das Protein gebunden ist.

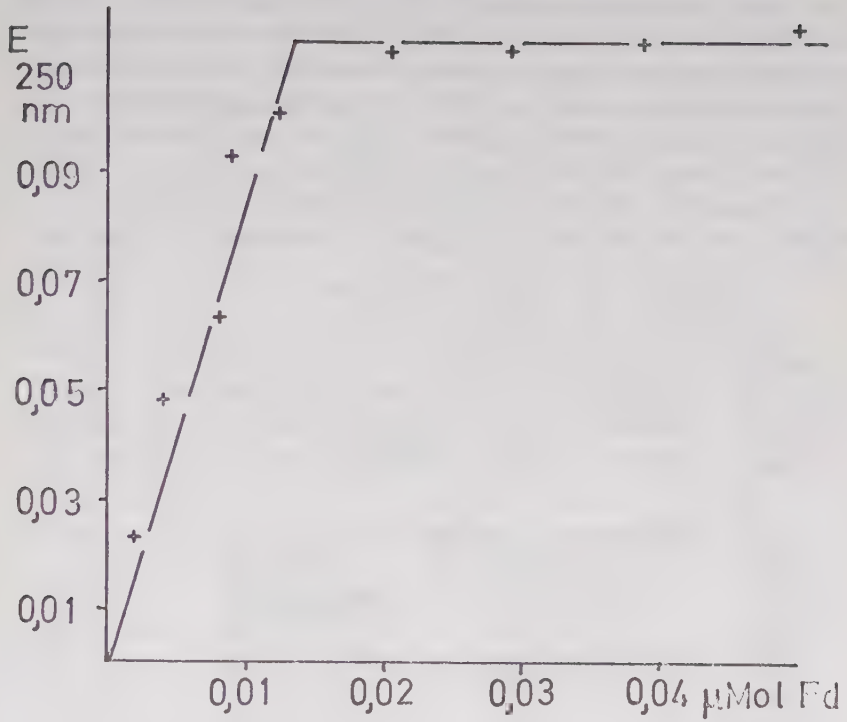


Abb. 7: Titration des Ferredoxins mit PCMB.
Bedingungen wie im experimentellen Teil (C VI c) beschrieben.

III. Molekulargewichtsbestimmungen

a) an Sephadex G-50

Bei der Chromatographie an Sephadex fiel auf, daß die zur Resynthese geeigneten Apoferredoxine, wie TCA-, DP- und PCMB-Apoferredoxin, zwar an der gleichen Stelle, aber vor dem nativen Ferredoxin eluiert wurden. Vermutet wurde deshalb eine Dimerisierung des Proteins über -S-S- Brücken bei der Abspaltung des Eisens und des "labilen Schwefels" (11,12). Die Molekulargewichte wurden deshalb an Sephadex G-50 genau bestimmt (Abb. 8) und mit den in der Ultrazentrifuge ermittelten Werten verglichen (Tabelle 5).

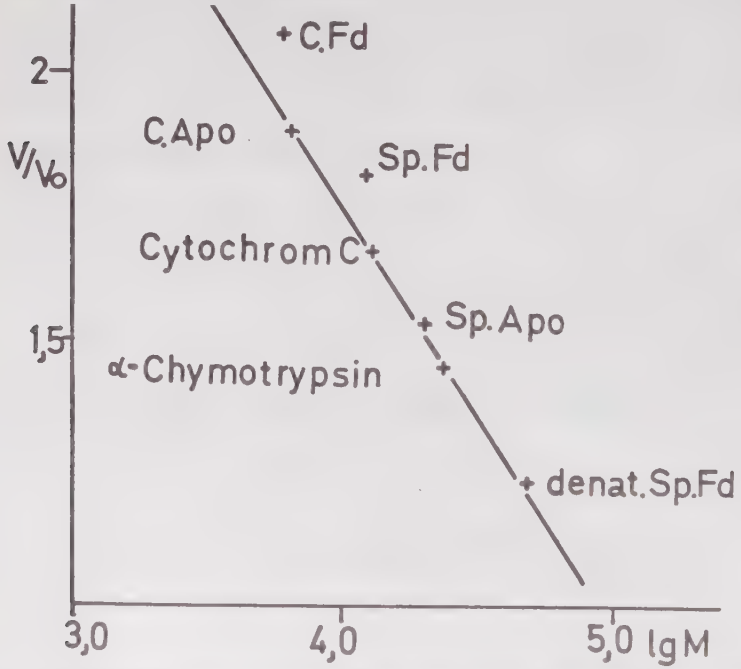


Abb. 8: Molekulargewichtsbestimmungen des nativen Ferredoxins und der Apoferredoxine an Sephadex G-50 (100 x 2,5 cm). Das Ausschlußvolumen V_o wurde mit Dextranblau bestimmt. Die Bezugspunkte wurden mit Cytochrom c und α-Chymotrypsin ermittelt.
C.Fd = Clostridienferredoxin;
C.Apo = Clostridienapoferredoxin;
Sp.Fd = Spinatferredoxin
Sp.Apo = Spinatapoferredoxin

b) mit der Ultrazentrifuge

Die Molekulargewichte des nativen Ferredoxins, des TCA- und des PCMB- Apoferredoxins und des durch Luftsauerstoff denaturierten Ferredoxins wurden außerdem in einer analytischen Ultrazentrifuge bestimmt[+]. Als spezifisches Volumen wurde 0,71 angenommen, wie es Bendall et al. (16) am Petersilienferredoxin bestimmt haben. Die Molekulargewichte wurden nach der Formel:

$$M = \frac{R \cdot T \cdot s_{20}}{(1 - v.\rho).D_{20}}$$

berechnet, wobei die Werte: $R = 8{,}313.10^7$, $T = 393\ ^{o}K$, $V = 0{,}71$ und $\rho = 1{,}0$ verwendet wurden. Representativ für alle Bestimmungen ist in Abb. 9 der Gleichgewichtslauf des CMC-TCA-Apoferredoxins wiedergegeben. Die gefundenen Molekulargewichte sind zusammen mit den durch Gelfiltration ermittelten und den theoretischen Werten in Tabelle 5 angegeben.

Abb. 9: Gleichgewichtslauf einer 0,5 prozentigen CMC-TCA-Apoferredoxinlösung in 0,01 M Phosphat -/0,15 M NaCl-Puffer bei 20 410 Upm.

[+] Herrn Bachowsky vom Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen danke ich herzlich für die Bestimmungen.

Substanz	s_{20}	D_{20}	Ultrazentrifuge	Sephadex G-50	Theorie[+)]
	sec.10^{13}	cm^2/sec_{7} 10^{7}			
natives Fd	1,4	10,1	11 640	9 700	11 490
ChC-TCA-Apofd	0,9	6,7	11 280	20 000	11 380
PCMB-Apofd	1,3	7,9	13 830	20 000	12 870
denat. Fd	1,15	3,3	31 820	50 000	34 140

Tabelle 5: Molekulargewichte, ermittelt mit der Ultrazentrifuge, und an Sephadex G-50.

+) Berechnet aus der Sequenz + 2 Glutamin S. + Glycin

Die mit der Ultrazentrifuge ermittelten Werte stimmen sehr gut mit den theoretischen Molekulargewichten überein. Für das durch Luftsauerstoff denaturierte Ferredoxin wurde der gleiche Wert wie beim Alfalfaferredoxin (38) gefunden. Die abweichenden Werte bei der Bestimmung der Molekulargewichte nach der Molekularsiebmethode weisen auf eine vom nativen Ferredoxin abweichende Molekülform der Apoferredoxine hin.

IV. Redoxsysteme des Ferredoxins

Nachdem sichergestellt war, daß die Apoferredoxine monomer vorliegen, wurde das Redoxsystem des Aktivzentrums untersucht. Es setzt sich aus dem Eisen, dem "labilen Schwefel" und den Mercaptogruppen der Cysteinreste zusammen.

a) Das Eisen-System

Vom Eisen sind die Oxidationsstufen 0 bis + IV bekannt. Beim Ferredoxin mit 2 g-Atomen Eisen pro Mol (2,17,24) könnte folgende Redoxkette, bzw. ein Teil davon am Aktivzentrum beteiligt sein:

A. $2\ Fe^{0} \underset{+2eo}{\overset{-2eo}{\rightleftharpoons}} 2\ Fe^{+} \underset{+2eo}{\overset{-2eo}{\rightleftharpoons}} 2\ Fe^{2+} \underset{+2eo}{\overset{-2eo}{\rightleftharpoons}} 2\ Fe^{3+} \underset{+2eo}{\overset{-2eo}{\rightleftharpoons}} Fe^{4+}$

(1) (2) (3) (4) (5)

ESR-Studien von Brintzinger et al. (40) an Bis-Hexamethylbenzol (Fe I) stützen Formel A.2.. Formel A.3. ist gesichert durch die quantitative Abspaltung des Eisens mit α,α'-Dipyridyl (2,6). Formel A.4. wird bewiesen durch den Tiron-Fe(III) -Komplex, der sich nach Behandlung des nativen Ferredoxins mit PCMS (18) oder PCMB (6) herstellen läßt. Auch ohne Blockierung der SH-Gruppen läßt sich der Eisen (III)-Komplex bei pH 12 gewinnen.

Die chemischen Untersuchungen beweisen folglich die Beteiligung eines Eisen(II)/Eisen(III)-Redoxsystems am Aktivzentrum des Ferredoxins.

b) Das Schwefel-System

Neben Eisen enthält das Ferredoxin 2 g-Atome "labilen Schwefel" pro Mol (Der Beweis, daß es sich hierbei nicht um Cystein-Schwefel handelt, wird in V. erbracht). Folgendes Redoxsystem kann am Gesamtsystem beteiligt sein:

B. $\underset{(1)}{2\ S^{2-}} \overset{-2e^{\ominus}}{\underset{+2e^{\ominus}}{\rightleftharpoons}} \underset{(2)}{{}^{-}S\text{-}S^{-}} \overset{-2e^{\ominus}}{\underset{+2e^{\ominus}}{\rightleftharpoons}} \underset{(3)}{S^{o}_{2}}$

Formel B.1. ist experimentell nach Fogo und Popowsky (10) beweisbar. Für Formel B.3. spricht die Umsetzung mit Triphenylphosphin unter Variation der Methode von Fackler und Coucouvanis (42). Das Triphenylphosphinsulfid wurde dabei nach Extraktion mit Chloroform durch kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie identifiziert[+]. Das Gaschromatogramm ist in Abb. 10 wiedergegeben. Das Massenspektrum stimmt in allen Einzelheiten mit dem von Williams et al. (43) angegebenen Spektrum überein (Abb. 12).

[+] Den Herren Dr. W. König und W. Ebbighausen danke ich für die Ausführung der Bestimmungen.

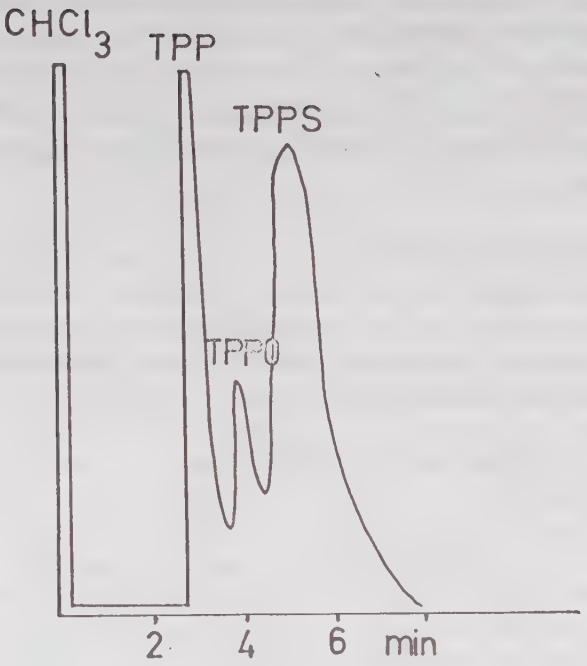


Abb. 10: Gaschromatogramm des Chloroformextraktes nach der Behandlung des Ferredoxins mit Triphenylphosphin (TPP). Bedingungen wie im experimentellen Teil (C.V.c.) beschrieben.

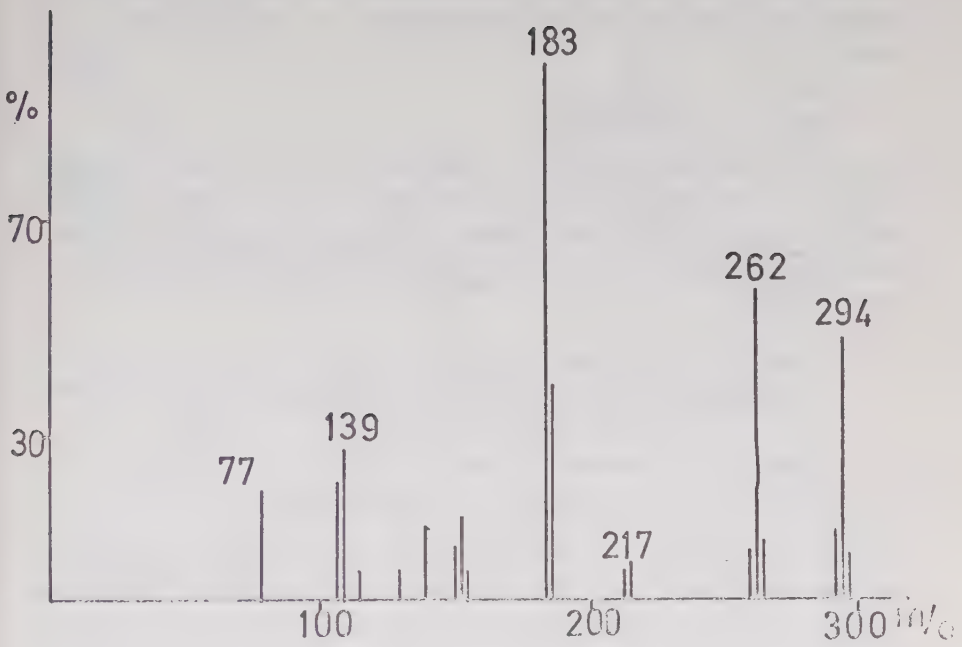


Abb. 11: Massenspektrum des Triphenylphosphinsulfids, dargestellt aus nativem Ferredoxin.

Qualitativ ist so eindeutig bewiesen, daß der "labile Schwefel" auch nach Formel B.3. reagieren kann. Quantitativ wurde der Nachweis an ^{35}S-Ferredoxin ausgeführt (Abschnitt V).

c) Das Cystein-System

Die Mercaptogruppen der fünf Cysteine (7) des Proteinanteils können formal auch als ein Teil des folgenden Redoxsystems angesehen werden:

$$\underset{(1)}{5\ R\text{-}S^-} \underset{+2eo}{\overset{-2eo}{\rightleftharpoons}} \underset{}{R\text{-}S\text{-}S\text{-}R,} \quad \underset{(2)}{3\ R\text{-}S^-} \underset{+2eo}{\overset{-2eo}{\rightleftharpoons}} \underset{(3)}{2\ R\text{-}S\text{-}S\text{-}R,} \quad R\text{-}S^-$$

Das System ist beim Spinatferredoxin überraschend wenig untersucht worden. Lediglich die Bestimmungen der gesamten SH-Gruppen mit PCMB stützen entweder Formel C.1. (7,17) oder Formel C.2. (2).

d) Das Persulfid-System

Im nativen Ferredoxin sind die Systeme A bis C zu einem Gesamtsystem mit dem extrem niedrigen Redoxpotential von $E_o' = -0{,}420$ V gekoppelt (5,17). Außerdem können die Systeme B und C ein Gesamtschwefel-System mit Persulfid- oder Trisulfid-Strukturen bilden, z.B.:

D. $5\ R\text{-}S^- + S_2^o \longleftrightarrow 2\ R\text{-}S\text{-}S^- + 3\ R\text{-}S^-$
(1) (2)

E. $5\ R\text{-}S^- + S_2^o \longleftrightarrow R\text{-}S\text{-}S\text{-}S\text{-}R + 3\ R\text{-}S^- + S^{2-}$
(1) (2)

Für die Beteiligung solcher Strukturen am Aktivzentrum sprechen die dem Ferredoxin ähnlichen Eigenschaften der Eisen-Persulfid-Komplexe, die von Bayer et al. (2) untersucht wurden.

V. Untersuchung an ^{35}S-Ferredoxin

Zur genaueren experimentellen Untersuchung des Gesamtschwefel-Systems erschien ^{35}S-Ferredoxin am besten geeignet. Dieses wurde, wie unter I.c. und im experimentellen Teil beschrieben, aus TCA-Apoferredoxin, $Na_2{}^{35}S$ und Eisen(II)-ammoniumsulfat in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol dargestellt (Tabelle 6). Um unspezifische Adsorption auszuschließen, wurde das synthetisierte ^{35}S-Ferredoxin an Sephadex G-50 chromatographiert (Abb. 12). In den Vorfraktionen, die das durch Luftsauerstoff denaturierte Ferredoxin enthalten, wurden ca. 1 Mol "labiler Schwefel" pro Mol Protein durch Radioaktivitätsmessungen bestimmt.

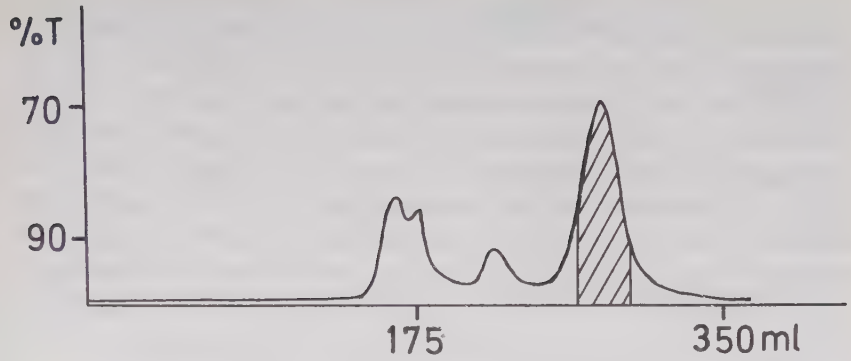


Abb. 12: Chromatogramm des ^{35}S-Ferredoxins an Sephadex G-50 (100 x 2,5 cm) mit 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4.

	µMol	Ausbeute %	E_{420}/E_{276}	dpm.10^{-6}	Fe^{2+} pro Mol	S^{2-} Mol	^{35}S Fd
natives Fd	5,84	-	0,43	-	2,1	2,1	-
^{35}S-Fd nach DEAE-Cellulose	5,17	90	0,33	114	2,2	2,4	1,8
^{35}S-Fd nach Sephadex G-50	2,34	50	0,45	44,5	2,1	2,1	1,7

Tabelle 6: Eigenschaften von ^{35}S-Ferredoxin

Die Tabelle 6 zeigt eindeutig, daß der "labile Schwefel" bei der Resynthese aus dem angebotenen Na_2S stammt und nicht aus den Cysteinresten des Proteins. Durch die Radioaktivität des ^{35}S-Ferredoxins ließen sich auch die verschiedenen Abbaureaktionen auf das genaueste verfolgen. Durchgeführt wurden die Versuche mit Trichloressigsäure (TCA), α, α'-Dipyridyl (DP) und Triphenylphosphin (TPP). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 7 a-c wiedergegeben.

	µMol	dpm.10^{-6} total	^{35}S/Mol Fd	"lab.S"/Mol Fd$^{+)}$
^{35}S-Ferredoxin	0,48	9,4	1,7	2,1
H_2S-Lösung	-	4,0	0,7	0,9
TCA-Lösung	-	4,6	0,8	1,0
Apofd	-	1,5	0,3	0,3
Apofd nach Sephadex G-50	0,37	0,96	0,2	0,3

Tabelle 7a: Abspaltung des "labilen Schwefels" mit Trichloressigsäure bei pH 1,7. Bedingungen siehe experimenteller Teil.
$^{+)}$ Berechnet aus Tabelle 6.

Tabelle 7a zeigt, daß bei der sauren Behandlung des Ferredoxins nicht aller "labile Schwefel" als H_2S frei wird. Überraschend viel Radioaktivität wird in der TCA-Lösung und im Apoferredoxin gefunden, ein Zeichen dafür, daß der "labile Schwefel" nicht ausschließlich in der Form S^{2-} vorliegt. Die Radioaktivität der TCA-Lösung kann nur durch Vorliegen von Hydrogendisulfid oder kolloidem Schwefel gedeutet werden, während die Radioaktivität des TCA-Apoferredoxins sich aus Persulfid- bzw. Trisulfid-Strukturen erklären läßt.

	µMol	dpm.10^{-6} total	^{35}S/Mol Fd	"lab.S"/Mol Fd$^{+)}$
^{35}S-Ferredoxin	0,24	4,7	1,7	2,1
H_2S-Lösung	-	3,6	1,3	1,6
DP- + Apofd-Lösung	-	1,5	0,5	0,6
Apofd nach Sephadex G-50	0,09	0,052	0,05	0,06

Tabelle 7b: Abspaltung des "labilen Schwefels" mit α,α'-Dipyridyl bei pH 5,2. Bedingungen siehe experimenteller Teil.
$^{+)}$ Berechnet aus Tabelle 6.

Bei der Abspaltung des "labilen Schwefels" mit DP wird mehr H_2S gefunden als bei der Behandlung mit TCA. Wesentlich geringer ist die Radioaktivität der DP-Lösung und besonders die des chromatographierten Apoferredoxins. Die Unterschiede erklären sich aus den milderen Bedingungen der DP-Reaktion. Die Reaktionszeit beträgt bei Zimmertemperatur ca. 24 Std. Dabei kann sich die reaktionsbestimmende Struktur aus dem Gleichgewicht der wahrscheinlich valenzisomeren Strukturen jedesmal neu einstellen, so daß die Umsetzung quantitativer erfolgt.

	µMol	dpm.10^{-6} total	^{35}S/Mol Fd	"lab.S"/Mol Fd$^{+)}$
^{35}S-Fd	0,072	1,37	1,7	2,1
TPPS-Lösung	-	1,34	1,6	2,0
Protein	-	0,02	0,02	0,03

Tabelle 7c: Abspaltung des "labilen Schwefels" mit Triphenylphosphin. Bedingungen siehe experimenteller Teil.
$^{+)}$ Berechnet aus Tabelle 6.

Tabelle 7c zeigt, daß der "labile Schwefel" quantitativ mit TPP reagiert. Kawamura et al. (44) kamen mit Tritium markiertem Triphenylphosphin zu dem gleichen Ergebnis. Der Proteinrest ist nach der Abspaltung von $^{35}S^{o}$ nur noch schwach radioaktiv. Die geringe Radioaktivität erklärt sich aber daraus, daß das Protein nicht weiter gereinigt werden konnte.

Das TCA-Apoferredoxin (Tabelle 7a) enthielt noch rund 10 % des eingebauten radioaktiven Schwefels. Um sicher zu sein, daß es sich hierbei nicht doch um Cystein-Schwefel, eventuell aus Dehydroalanin und $Na_2{}^{35}S$ gebildet, handelt, wurde das an Sephadex G-50 gereinigte Apoferredoxin mit TPP umgesetzt (Tabelle 7d).

	µMol	dpm.10^{-6} total	^{35}S/Mol Fd	"lab.S"/Mol Fd
TCA-Apofd nach Sephadex G-50	0,062	0,161	0,22	0,27
TPPS-Lösung	-	0,160	0,21	0,26
Protein	-	0,018	0,02	0,03

Tabelle 7d: Abspaltung von ^{35}S aus dem TCA-Apoferredoxin mit TPP. Genaue Bedingungen siehe experimenteller Teil.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, reagiert der restliche radioaktive Schwefel mit TPP. Das kann nur durch eine Persulfid- oder eine Trisulfid-Struktur erklärt werden, da TPP nur mit Schwefel in der Oxidationsstufe null reagiert. Dies wurde an Vergleichssubstanzen, die unter den gleichen Bedingungen wie das TCA-Apoferredoxin und das native Ferredoxin mit TPP behandelt wurden, bewiesen (Tabelle 8). Die Identifizierung erfolgte wiederum durch kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie.

natives Ferredoxin	+++
TCA-Apoferredoxin	++
Natriumsulfid (p.a.)	++
Natriumsulfid (frisch hergestellt)	+
Cystein	-
Cystin	-
Serumalbumin	-
Ribonuclease	-

Tabelle 8: Gaschromatographische-massenspektrometrische Bestimmung von TPPS bei der Reaktion von Triphenylphosphin mit Vergleichssubstanzen.

+++ stark positiv (annähernd quantitativ)
++ positiv
+ schwach positiv
- negativ

Die Tabelle 8 zeigt eindeutig, daß der Cystein- und der Cystin-Schwefel nicht mit TPP reagiert. Die schwache Reak-

tion mit Na_2S erklärt sich aus der steten Gegenwart von Polysulfiden. Damit ist eindeutig bewiesen, daß der "labile Schwefel" auf gar keinen Fall aus den Cysteinresten des Proteins stammen kann, sondern anorganischen Ursprungs ist. Gleichzeitig weisen die Untersuchungen auf die Beteiligung von Persulfid- bzw. Trisulfid-Grenzstrukturen am Aktivzentrum des Ferredoxins hin.

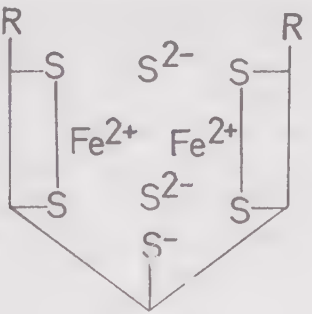
VI. Simultanbestimmung des Eisens, des "labilen Schwefels" und der Mercaptogruppen der Cysteinreste

Um genauere Aussagen über die Gesamtoxidationsstufe und damit über die Struktur des Aktivzentrums machen zu können, ist eine gleichzeitige Bestimmung aller beteiligten Komponenten erforderlich. Deshalb wurden die Reaktionsprodukte bei fünf verschiedenen Abbaureaktionen quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

a) Abbau mit α,α'-Dipyridyl

Der Abbau des Aktivzentrums des Ferredoxins wurde, wie unter I.a. und im experimentellen Teil beschrieben, mit DP bei pH 5,2 ausgeführt. Eisen(II) wurde aus dem gebildeten Dipyridyl-Komplex, Sulfid nach Übertreiben in eine alkalische Zinkacetatlösung als Methylenblau und die freien Mercaptogruppen der Cysteinreste durch Carboxymethylierung mit Jodessigsäure-2-^{14}C entweder aus der Radioaktivität oder durch Aminosäureanalyse des ^{14}CMC- Proteins bestimmt. Die Ergebnisse sind unter A. in Tabelle 9 wiedergegeben. Kontrolluntersuchungen und der Abbau in einer 8 M Harnstofflösung brachten das gleiche Ergebnis. Die wahrscheinliche reaktionsbestimmende Struktur ist in Formel A. wiedergegeben:

A,



	Fe^{2+}	Fe^{3+}	S^{o}	S^{2-}	$R\text{-}S^{-}$
	pro Mol Ferredoxin				
A. Ferredoxin + DP	1,8	-	-	1,8	2,0 (1,7)+)
B. Ferredoxin + TCA	1,9	-	-	1,4	1,8
C. Ferredoxin + Tiron	-	1,7	-	1,5	2,8 (2,9)+)
D. Ferredoxin + PCMB	-	1,8	-	7,7	
E. Ferredoxin + TPP	1,2	-	2,0	-	4,7

Tabelle 9: Oxidationsstufen des Eisens, des "labilen Schwefels" und der Cysteinreste bei verschiedenen Abbaureaktionen.
+) Bestimmt durch Aminosäureanalyse.

b) Abbau mit Trichloressigsäure

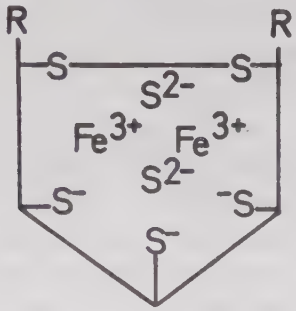
Der Abbau des Aktivzentrums ließ sich auch mit Trichloressigsäure (TCA) durchführen. Die Ergebnisse sprechen für die gleiche reaktionsbestimmende Grenzstruktur wie bei dem DP-Abbau. Allerdings schwankten die H_2S- Werte bei Kontrollversuchen beträchtlich (0,8 - 1,5 g-Atome pro Mol Fd). Ein weiterer Hinweis dafür, daß das Aktivzentrum als ein valenzisomeres System aufzufassen ist. Bei der TCA- Reaktion werden die Bedingungen viel drastischer geändert als bei der DP- Reaktion, so daß das Ferredoxin auch aus anderen Strukturen reagieren kann.

c) Abbau mit Tiron

Im alkalischen Medium bei pH 12 ließ sich der Abbau des Aktivzentrums außerordentlich leicht mit Tiron, einem Eisen(III)-Komplexbildner, ausführen (siehe experimenteller Teil C.II.d). Der Eisen(III)-Gehalt wurde nach dem Ansäuren auf pH 4,7 aus der Extinktion bei 560 nm bestimmt, die Mercaptogruppen der

Cysteinreste und der "labile Schwefel" wie bei den vorhergehenden Abbaureaktionen. Die Ergebnisse sind unter C. der Tabelle 9 zusammengefaßt. Sie entsprechen in diesem Fall einer reaktionsbestimmenden Struktur mit einer Disulfidbrücke im Protein, z.B.:

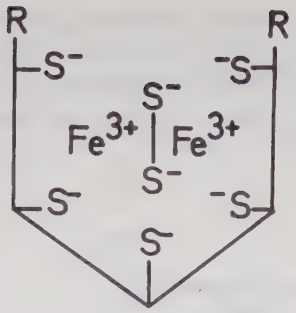
B.



d) Abbau mit p-Chlor-mercuribenzoat

Durch p-Chlor-mercuribenzoat (PCMB) wurde das Aktivzentrum schon bei neutralen pH zerstört. Dabei ließ sich das Eisen(III) mit Tiron nachweisen (D. Tabelle 9). Aus der Extinktionserhöhung bei 250 nm nach Boyer (45) ließ sich die Gesamtzahl der mercurierten SH-Gruppen bestimmen (Abb. 7). Die gefundenen 7,7 SH-Äquivalente stehen im Widerspruch zu Tagawa und Arnon (17) und Matsubara et al. (7), die nach der gleichen Methode 9 bzw. 8-9 SH-Äquivalente finden. 9 SH-Äquivalente würden aber eine quantitative Bestimmung des "labilen Schwefels" in der elementaren Form ausschließen, was aber von Kawamura et al. (44) mit Tritium- markiertem Triphenylphosphin und in dieser Arbeit an ^{35}S-Ferredoxin eindeutig bewiesen wurde. Der hier gefundene Wert der PCMB-Titration spricht für etwa folgende reaktionsbestimmende Struktur:

c.

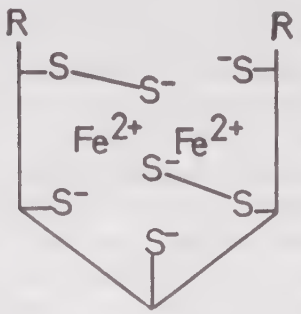


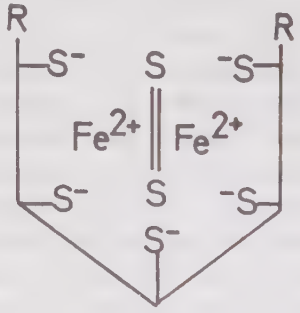
Die abweichenden Ergebnisse ließen sich eventuell durch Sekundärreaktionen des gebildeten, sicherlich instabilen Hydrogendisulfids erklären.

e) Abbau mit Triphenylphosphin

Mit Triphenylphosphin reagiert der "labile Schwefel" in der elementaren Form (Abschnitt V.). Die gleichzeitig bestimmten Eisen- und Cystein-SH-Werte sind in Tabelle 9 wiedergegeben, und sprechen für folgende Strukturen:

b.





Der relativ niedrige Eisen(II)-Wert von 1,2 g-Atomen pro Mol Protein erklärt sich aus dem Aufarbeitungsverfahren, das nach der Bestimmung des elementaren Schwefels nicht mehr streng anaerob durchgeführt werden konnte.

VII. Strukturmodell des Aktivzentrums

In Abb. 13 ist eine räumliche Struktur des Aktivzentrums des Ferredoxins wiedergegeben, aus der sich alle chemisch faßbaren Strukturen ableiten lassen. Diese Vorstellung wird gestützt durch den von Dahl et al. (46) röntgenographisch aufgeklärten Eisen-Schwefel-Hexacarbonyl-Komplex, der die gleiche Struktur besitzt. Wahrscheinlich wird das eigentliche Zentrum aus dem Eisen, dem "labilen Schwefel" und vier Cystein gebildet. Außerdem vervollständigen vermutlich zwei Aminosäuren bzw. zwei unbekannte Liganden die Koordination des Eisens.

Gestützt wird diese Vorstellung durch die Beobachtung, daß das Eisen bei kurzer Reaktionszeit und annähernd neutralen Bedingungen während der Abbaureaktion mit DP oder Tiron als farbiger Komplex am Protein fixiert bleibt und sich so am Protein gebunden an Sephadex teilweise isolieren läßt. Daß die Bindung des Aktivzentrums an das Protein nicht allein über die Cystein erfolgt, zeigte Kimura (8) am Adrenodoxin, wo das Eisen nach Behandlung mit PCMB am Protein gebunden nachgewiesen wurde.

In Abb. 13 ist außerdem ein Cystein als vermuteter Brückenligand eingezeichnet. Ähnliche Liganden sind bei Sauerstoff-Komplexen bekannt (47). Durch einen Brückenliganden wird die nicht axiale aber symmetrische Struktur des ESR-Spektrums des reduzierten Ferredoxins erklärbar (2,30,31). Für eine Beteiligung auch des fünften Cysteins spricht der Befund, daß sich beim nativen Ferredoxin keine Mercaptogruppe mit Jodessigsäure carboxymethylieren läßt und daß eine Resynthese mit carboxymethyliertem Apoferredoxin nicht möglich ist. Die angegebene Struktur des Aktivzentrums bedarf der Bestätigung durch Röntgenstrukturanalysen, die aber bis jetzt an der Zersetzlichkeit und dem schlechten Kristallisationsvermögen des Ferredoxins scheiterten.

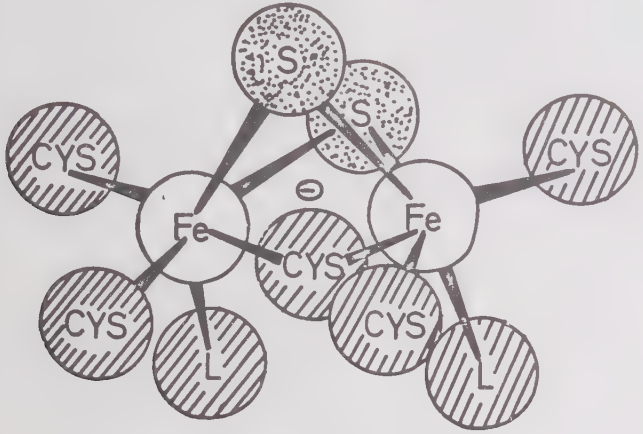


Abb. 13: Wahrscheinliche räumliche Struktur des Aktivzentrums des Ferredoxins.

C. Experimenteller Teil

I. Isolierung des Ferredoxins aus Spinat

20 kg Spinat wurden mit kaltem Wasser gewaschen und in einem automatischen Entsafter bei ca.6 000 Upm entsaftet. Die weitere Aufarbeitung wurde bei 0-3°C durchgeführt. Der Rohsaft wurde auf eine vierfache Lage Mull gegeben und das Filtrat (10 Liter) mit einem Liter 1 M Tris-HCl-Puffer pH 8 versetzt. Dann wurden unter Rühren 5,4 Liter auf -60°C gekühltes Aceton zugegeben. Nach zwei Stunden wurden die ausgefallenen Stoffe in einer Durchlaufzentrifuge (Firma Cepa) bei 30 000 Upm abgetrennt. Zur Adsorption des Ferredoxins wurde der Durchlauf mit entlüfteter, mit Wasser äquilibrierter DEAE-Cellulose (Firma Serva, 50 g Trockengewicht) versetzt. Das verwendete Säulenmaterial und die Puffer wurden vor Gebrauch entlüftet und mit N_2 gesättigt. Nach 15 Minuten wurde die Cellulose in der Durchlaufzentrifuge abgetrennt, in einem Liter 0,1 M Acetatpuffer pH 7,4 suspendiert und in eine Säule mit 7 cm Durchmesser gefüllt. Das Ferredoxin wurde mit 1 M Acetat-Puffer pH 7,4 eluiert. Die rotbraune Lösung (ca. 100 ml) wurde mit Wasser im Verhältnis 1 : 5 verdünnt und an einer DEAE-Cellulosesäule (20 x 4 cm) (Whatman DE 52) gesammelt. Das Ferredoxin wurde mit 1 M Acetatpuffer pH 7,4 eluiert. Vor-, Haupt- und Nachlauf wurden getrennt aufgefangen. Der Nachlauf enthielt größere Mengen einer bei 259 nm absorbierenden Substanz und mußte gesondert aufgearbeitet werden. Der Hauptlauf (ca. 20 ml) wurde auf eine Sephadex G-75-Säule (100 x 2,5 cm), die mit 0,1 M Acetat-Puffer pH 7,4 äquilibriert war, aufgetragen und mit dem gleichen Puffer chromatographiert.

Das nach ca. 600 ml eluierte Ferredoxin wurde an einer DEAE-Cellulosesäule (5 x 2 cm) gesammelt und mit 1 M Acetat-Puffer pH 7,4 eluiert. Die Ausbeute betrug ca. 300 mg, das Extinktionsverhältnis $E\ 420/_{E\ 276}$ lag zwischen 0,35 und 0,41. Eingefroren war das Ferredoxin monatelang stabil. Vor der Verwendung wurde das Ferredoxin durch Chromatographie mit 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4 an Sephadex G-50 (100 x 2,5 cm) nochmals

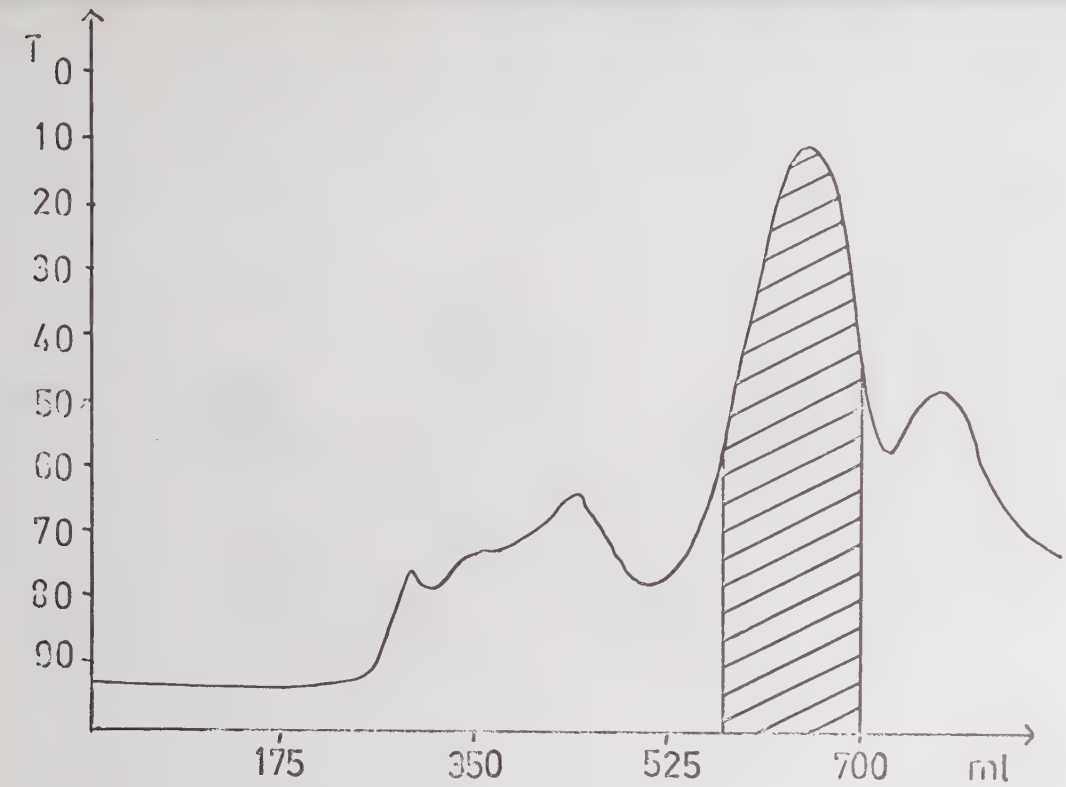


Abb. 14: Chromatogramm des rohen Ferredoxins an Sephadex G-75 (100 x 2,5 cm), mit 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4. Die Transmission (T) wurde mit einem Uvicord (LKB Stockholm) bei 280 nm registriert. Das Eluat wurde in 17,5 ml Fraktionen gesammelt.

gereinigt (Abb. 15). Das Verhältnis $E\ 420/_{E\ 276}$ lag zwischen 0,42 und 0,46. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß sich bei einer Gradientenelution (0,1 M/1 M Acetat-Puffer pH 7,4) zwei Ferredoxine isolieren ließen, die aber in ihren

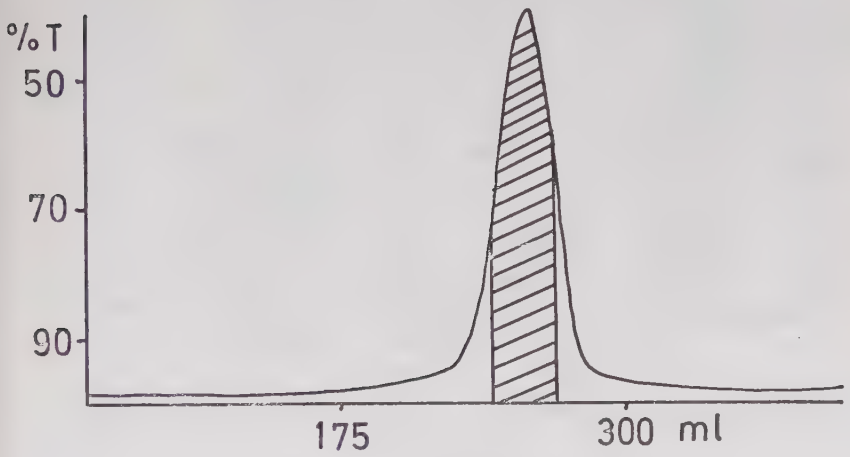


Abb. 15: Chromatogramm des Ferredoxins an Sephadex G-50 (100 x 2,5 cm). Bedingungen wie bei Abb. 14.

Eigenschaften identisch waren (Abb. 16). Wahrscheinlich bildeten die sauren Aminosäuren im Laufe der Aufarbeitung Salze, die sich an die Diäthylaminogruppen der DEAE-Cellulose nicht mehr anlagern konnten. Das Ferredoxin wurde deshalb zum Teil schon bei einer geringen Salzkonzentration eluiert.

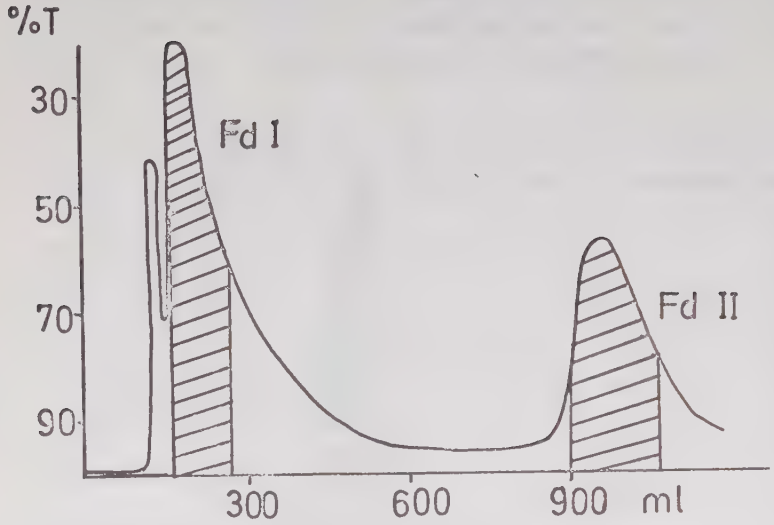


Abb. 16: Gradientenchromatographie des Ferredoxins an DEAE-Cellulose (40 x 4 cm). Gradient: 0,1 M / 1 M Acetat-Puffer pH 7,4, 10 ml Fraktionen.

II. Abbaureaktionen des Ferredoxins

a) mit α,α'-Dipyridyl

2,88 µMol Ferredoxin in 20 ml 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4 wurden unter Stickstoff mit 25 ml 0,5 %-iger DP-Lösung in 0,1 M Acetat-Puffer pH 5,2 versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Tage bei 4°C gerührt, durch Lyophilisieren eingeengt und an Sephadex G-25 (100 x 2,5 cm) mit Wasser chromatographiert (Abb. 17).

Das nach ca. 150 ml eluierte DP-Apoferredoxin wurde gesammelt und lyophilisiert. Ausbeute: 55 % (Absorptionsspektrum Abb. 3).

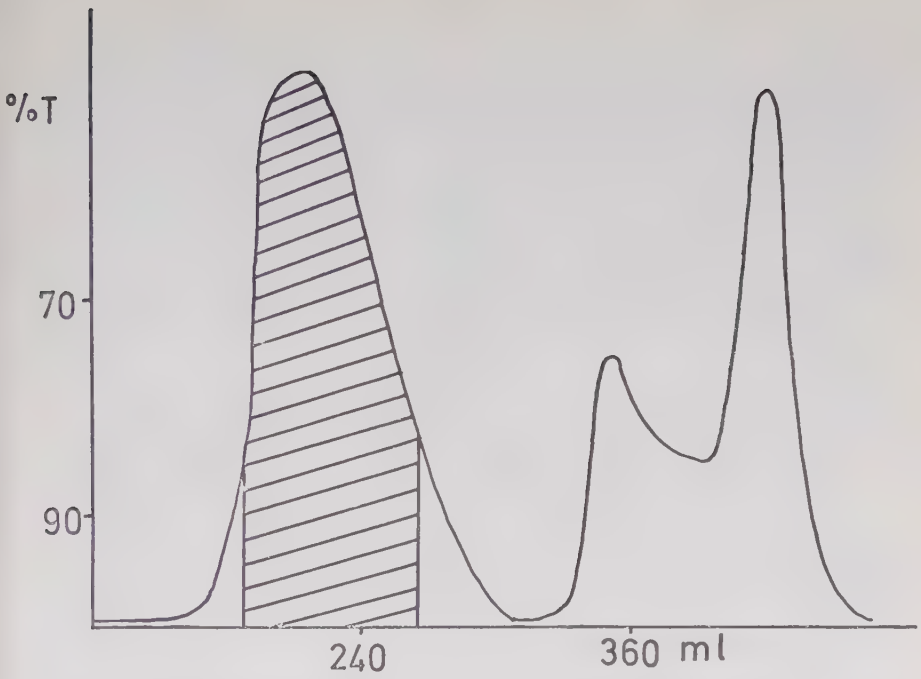


Abb. 17: Chromatogramm des DP-Apoferredoxins an Sephadex G-25 (100 x 2,5 cm). Bedingungen wie bei Abb. 14.

b) mit Trichloressigsäure

Zu 2,5 µMol Ferredoxin in 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4 wurden unter Stickstoff eine 10 %-ige TCA-Lösung zugetropft, bis pH 1,7 erreicht war. Nach fünf Stunden wurde die Reaktionsmischung 10 Minuten bei 10 000 Upm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 10 ml Tris-HCl-Puffer pH 8,6 gelöst und an Sephadex G-50 (100 x 2,5 cm) mit Wasser chromatographiert. (Abb. 18) Ausbeute nach der Gefriertrocknung: 82 % (Absorptionsspektrum Abb. 3).

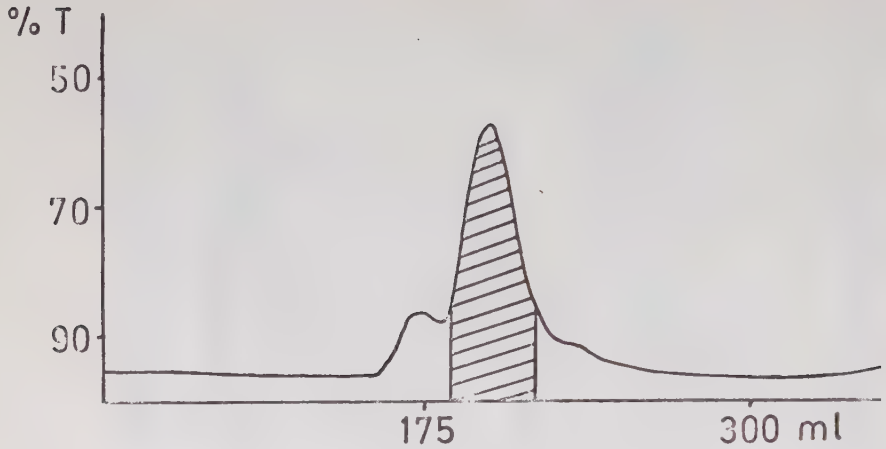


Abb. 18: Chromatogramm des TCA-Apoferredoxins an Sephadex G-50 (100 x 2,5 cm). Bedingungen wie bei Abb. 14.

c) mit p-Chlor-mercuribenzoat

Zu 1,4 µMol Ferredoxin in 0,2 M Acetat pH 7,4 wurden unter Stickstoff 100 µMol PCMB, gelöst in 10 ml Wasser, zugegeben. Nach 30 Minuten wurden 10 ml einer 1 %-igen wässrigen Tiron-Lösung zugesetzt, um das Eisen(III)-Komplex zu binden. Die Reaktionslösung wurde nach einer Stunde durch Lyophilisieren eingeengt und über Sephadex G-50 mit Wasser chromatographiert (Abb. 19). Ausbeute nach Gefriertrocknung: 60 % (Absorptionsspektrum Abb. 3).

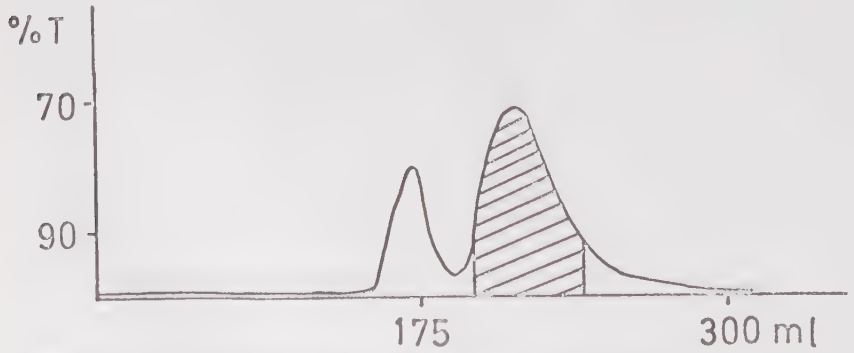


Abb. 19: Chromatogramm des PCMB-Apoferredoxins an Sephadex G-50 (100 x 2,5 cm). Bedingungen wie bei Abb. 14.

d) mit Tiron

Zu 2,53 µMol Ferredoxin in 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4 wurden 3,3 ml 1 %-ige wässrige Tiron-Lösung gegeben. Unter Stickstoff wurde mit 1 N NaOH der pH 12 eingestellt. Nach 5 Stunden wurde das Protein mit 20 %-iger TCA-Lösung bei pH 3,5 gefällt, in 10 ml Tris-HCl-Puffer pH 8,6 gelöst und an Sephadex G-50 chromatographiert. Das erhaltene Chromatogramm ist identisch mit Abb. 18. Das Absorptionsspektrum entspricht dem des TCA- und DP-Apoferreoxins. Ausbeute nach der Gefriertrocknung: 57 %.

e) mit Triphenylphosphin

1 µMol Ferredoxin in 2 ml 1 M Acetat-Puffer pH 7,4 wurde unter Argon mit 1,3 ml Aceton versetzt. Dazu wurden 5 mg TPP in einer 40 %-igen wässrigen, sauerstoffreien Aceton-Lösung gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 80 Stunden bei 4°C gerührt, am Rotationsverdampfer von den Lösungsmitteln befreit und die TPP-Reaktionsprodukte mit Chloroform extrahiert. Der Proteinrückstand wurde in 10 ml 1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,6 gelöst und an Sephadex G-50 (100 x 2,5 cm) chromatographiert. Das Absorptionsspektrum und das Chromatogramm sind identisch mit denen des TCA- und DP- Apoferredoxins. Ausbeute nach der Gefriertrocknung: 50 %.

III. Resynthesen des Ferredoxins

a) mit 2-Mercaptoäthanol, Natriumsulfid und Eisen(II)-ammoniumsulfat

1. aus DP-Apoferredoxin

5 mg Apoferredoxin wurden in 5 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 gelöst und nacheinander mit 0,1 ml 2-Mercaptoäthanol, 4 ml einer Natriumsulfidlösung (4 µMol/ml) und 4 ml einer frisch hergestellten Eisen(II)-ammoniumsulfat-Lösung (4 µMol/ml) versetzt. Die Mischung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend auf eine Whatman DE-52 Cellulosesäule (3 x 0,5 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit

50 ml 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4 gewaschen und danach das resynthetisierte Ferredoxin mit 1 M Acetat-Puffer pH 7,4 eluiert. Ausbeute 34 %, Absorptionsspektrum Abb. 4.

Nach der gleichen Vorschrift gelang auch die Resynthese des Ferredoxins, wenn 2-Mercaptoäthanol durch Dithioerythrit, Cysteamin oder Cysteinmethylester ersetzt wurde.

Die Resynthese gelang auch ohne Sulfidzusatz in 5 %-iger Ausbeute, wenn das 2-Mercaptoäthanol ohne vorhergehende Reinigung verwendet wurde. Mit einmal destilliertem 2-Mercaptoäthanol erfolgte keine Resynthese (Gaschromatographisch wurden im nicht gereinigten Präparat ca. 0,1 % H_2S gefunden).

2. aus PCMB-Apoferredoxin

Nach der gleichen Methode wie beim DP-Apoferredoxin gelang auch die Resynthese des Ferredoxins aus dem PCMB-Apoferredoxin. Vor der eigentlichen Resynthese wurde jedoch 12 Stunden mit 0,5 ml 2-Mercaptoäthanol incubiert, um die Hg-S-Bindungen zu lösen. Ausbeute 12 %, Absorptionsspektrum Abb. 4.

3. aus TCA-Apoferredoxin

Die Resynthese des Ferredoxins aus TCA-Apoferredoxin sei am Beispiel des ^{35}S-Ferredoxins beschrieben:

Aus 70 mg Ferredoxin wurde, wie unter C.II.b. beschrieben, TCA-Apoferredoxin hergestellt. Der erhaltene Niederschlag wurde einmal mit 5 %-iger TCA-Lösung gewaschen. Das Apoferredoxin wurde unter Stickstoff in 10 ml 1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,1 gelöst und mit 0,2 ml frisch destilliertem 2-Mercaptoäthanol versetzt. Anschließend wurden 14, 7 µMol Natriumsulfid-^{35}S (1 µMol entsprach $12,21.10^6$ dpm) in 1 ml Wasser und 20 µMol Eisen(II)-ammoniumsulfat in 1 ml Wasser zugegeben. Nach 10 Minuten wurde mit Wasser im Verhältnis 1 : 5 verdünnt und die Reaktionsmischung auf eine DEAE-Cellulosesäule (15 x 0,5 cm) aufgetragen. Gewaschen wurde mit 70 ml 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4. Anschließend wurde das resynthetisierte Ferredoxin mit 1 M Acetat-Puffer pH 7,8 eluiert. Ausbeute 90 %, siehe Tabelle 6. 56 mg ^{35}S-Ferredoxin in 9 ml 1 M Acetat-Puffer pH 7,8 wurden dann an Sephadex G-50 (100 x 2,5 cm) mit 0,2 M

Acetat-Puffer pH 7,4 chromatographiert (Abb. 12). Ausbeute: 50 %, siehe Tabelle 6.

Wurde das Apoferredoxin vor der Umsetzung an Sephadex gereinigt, so erfolgte die Resynthese nur in 50 % Ausbeute, wahrscheinlich infolge von Oxidationsreaktionen.

Eine Resynthese erfolgte nicht, wenn das TCA-Apoferredoxin vorher mit Jodessigsäure an den freien Cystein-Mercaptogruppen carboxymethyliert wurde.

Aus dem beim Abbau mit Tiron und TPP erhaltenen Proteinen gelang die Resynthese nach diesem Verfahren nicht.

b) mit einem Eisen-Persulfid-Komplex

Darstellung des Eisen-Persulfid-Komplexes:
Unter Stickstoff wurden bei Zimmertemperatur 113,5 mg Cysteamin-hydrochlorid und 392 mg Mohrsches Salz in 20 ml Wasser gelöst. Danach wurden 32 mg Schwefel und 25 ml 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 9 zugegeben. Nach wenigen Minuten war der Schwefel gelöst und der braune Komplex entstanden.

Zur Resynthese wurden unter Stickstoff 5 mg DP-Apoferredoxin mit 5 ml der Eisen-Persulfid-Lösung versetzt. Nach zwei Stunden wurde mit Wasser im Verhältnis 1 : 10 verdünnt und die Mischung auf eine DEAE-Cellulosesäule (5 x 1 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 ml 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4 gewaschen und das Ferredoxin mit 1 M Acetat-Puffer pH 7,4 eluiert. Ausbeute: 45 %.

IV. Eisenbestimmungen

a) mit α, α'-Dipyridyl(DP) als Eisen(II)

Der Eisen(II)-Gehalt des Ferredoxins wurde in über 50 Bestimmungen durch Komplexbildung mit DP bestimmt. Die dazu benötigte Eichkurve wurde mit Eisen(II)-ammoniumsulfat aufgestellt. Gefunden wurden 1,8 - 2,3 g-Atome Eisen(II) pro Mol Protein, mit einem Mittelwert von 2,1 g-Atomen. Die Bestimmungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

0,0575 µMol Ferredoxin in 1 ml 0,2 MAcetat-Puffer pH 7,4 wurden in einem 10 ml Kolben mit 1 ml DP-Lösung (5 g gelöst in 1 000 ml 0,1 M Acetat-Puffer pH 5,4) versetzt. Nach 15 Stunden wurde mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 525 nm in 1 cm Küvetten mit einem Zeiss PMQ II Spektrometer gemessen:

$$E_{525\ nm} = 0,090 = 0,120\ Fe^{2+}\mu Mol$$

Die Ferredoxinprobe enthielt also 2,1 g-Atome Eisen(II) pro Mol Protein.

In den Apoferredoxinen wurden nach dieser Methode 0 bis 0,3 g-Atome gefunden. Die resynthetisierten Ferredoxine enthielten 1,9 bis 2,4 g-Atome.

b) mit Tiron als Eisen(III)

1. nach Behandlung mit p-Chlor-mercuribenzoat (PCMB)

0,07 µMol Ferredoxin in 2,3 ml 0,15 M Acetat-Puffer pH 7,4 wurden in einer 1 cm Küvette mit 0,1 ml Tiron-Lösung (10 mg/ml) und 0,1 ml PCMB-Lösung (3,8 mg/ml) versetzt. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion bei 560 nm gemessen.

$$E_{560nm} = 0,161 = 0,13\ \mu Mol\ Fe^{3+}$$

Die Ferredoxinprobe enthielt also 1,8 g-Atome Eisen(III) pro Mol Protein. Die Eichkurve wurde mit Eisen(III)-ammoniumsulfat aufgenommen.

2. nach Behandlung mit 1 N NaOH bei pH 12

0,278 µMol Ferredoxin in 2 ml 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4 wurden unter Stickstoff mit 0,1 ml Tiron-Lösung (10 mg/ml) versetzt und mit 1 N NaOH auf pH 12 gebracht. Nach 2 Stunden wurde mit 10 %-iger TCA-Lösung der pH 4,7 eingestellt. Mit Wasser wurde auf 10 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 560 nm in 1 cm Küvetten gemessen:

$$E_{560\ nm} = 0,128 = 0,56\ \mu Mol\ Fe^{3+}$$

Die Ferredoxinprobe enthielt also 2,0 g-Atome Eisen(III) pro Mol Protein.

V. Bestimmungen des "labilen Schwefels"

a) als S^{2-} durch die Methylenblau-Reaktion

Der Gehalt des Ferredoxins an "labilem Schwefel" wurde in über 50 Bestimmungen durch die Methylenblau-Reaktion (10) ermittelt. Die Eichkurve wurde mit Na_2S aufgestellt. Gefunden wurden 1,5 - 2,2 g-Atome "labiler Schwefel" pro Mol Ferredoxin. Als Mittelwert ergaben sich 1,9 g-Atome. Die Bestimmungen wurden wie folgt durchgeführt:

Zu 0,0575 µMol Ferredoxin in 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4 wurden in einem 10 ml Kolben 4 ml 1 %-ige Zinkacetat-Lösung und 0,2 ml 12 %-ige NaOH gegeben. Nach 10 Minuten wurde 1 ml p-Amino-dimethylanilinhydrochlorid-Lösung (1 g gelöst in 1 000 ml 5,5 N HCl) zugesetzt. Nach 30 Minuten wurden 0,2 ml $FeCl_3$- Lösung (0,023 M $FeCl_3$ in 1,2 N HCl) zugegeben. Nach 30 Minuten wurde mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt, bei 10 000 Upm zentrifugiert und die Extinktion bei 670 nm mit einem Zeiss PMQ II Spektrometer in 1 cm Küvetten gemessen:

$$E_{670\ nm} = 0,286 = 0,11\ \mu Mol\ S^{2-}$$

Die Ferredoxinprobe enthielt also 1,9 g-Atome S^{2-} pro Mol Protein.

In den Apoferredoxinen wurde nach dieser Methode kein "labiler Schwefel" gefunden. Die resynthetisierten Ferredoxine enthielten 1,9 - 2,4 g-Atome pro Mol.

b) aus der Radioaktivität von ^{35}S-Ferredoxin

^{35}S-Ferredoxin wurde dargestellt, wie unter C.III.a.3. beschrieben worden ist. Die Radioaktivität der Proben wurde mit einem TRI-CARB Flüssigkeitsszintillationszähler der Firma Packard Instrument GmbH, Frankfurt, gemessen. Als Szintillationsflüssigkeit wurden 10 ml der von Bray (39) beschriebenen Mischung verwendet:

200 mg (2,2'-p-Phenylen-bis(5-phenyloxazol) (POPOP)
4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)
60 g Naphthalin
100 ml Methanol
20 ml Äthylglycol
mit Dioxan wurde auf 1 000 ml aufgefüllt.

Das eingesetzte Natriumsulfid-^{35}S besaß eine spezifische Aktivität von 5,5 µC / µMol. 1 µC entspricht $2{,}22 \cdot 10^{6}$ dpm. $12{,}21 \cdot 10^{6}$ dpm waren demnach 1 µMol ^{35}S äquivalent. Da die Quantenausbeute von der Zusammensetzung der Reaktionslösung abhängig ist, mußte die "Efficiency" mit einem Standard bei jeder Messung bestimmt werden. Bei den Messungen wurden $7{,}335 \cdot 10^{-4}$ µMol Natriumsulfid-^{35}S entsprechend 8 956 dpm als Standard verwendet. Außerdem mußte der "Background" bei jeder Messung berücksichtigt werden. Die Bestimmungen wurden wie folgt durchgeführt:

Eingesetzt wurde 0,025 ml Ferredoxinlösung ($1{,}2 \cdot 10^{-3}$ µMol). Gezählt wurden 15 549 cpm. Der "Background" ergab sich zu 17 cpm. Die "Efficiency" betrug 64,6 %. Berechnet wurden daraus 24 000 dpm, das entspricht $2{,}05 \cdot 10^{-3}$ µMol ^{35}S. Das ^{35}S-Ferredoxin enthielt demnach 1,7 Mol ^{35}S pro Mol Ferredoxin.

c) als S^o mit Triphenylphosphin (TPP)

1. durch kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Der Abbau des Ferredoxins wurde wie unter C.II.e mit TPP ausgeführt. Der Chloroformextrakt wurde auf 10 ml eingeengt und 1 µl davon auf eine 5 % SE 30-Säule (1/8" Ø) aufgetragen. Mit Helium als Trägergas (30 ml/min) wurde das Triphenylphosphinsulfid bei 210°C vom Triphenylphosphin und einer Spur Triphenylphosphinoxid abgetrennt (Abb. 10). Das Triphenylphosphinsulfid wurde durch das Massenspektrum (Abb. 11) charakterisiert, aufgenommen bei einer Elektronenenergie von 50 eV mit einem Rheniumband als Kathodenmaterial. Die Untersuchung wurde mit dem Gaschromatograph-Massenspektrometer LKB 9 000 A ausgeführt.

Unter den gleichen Bedingungen wurden Apoferredoxin, Serumalbumin, Ribonuclease, Cystein, Cystin und Natriumsulfid untersucht (Tabelle 8).

2. durch die Radioaktivität des Triphenylphosphinsulfids-^{35}S

^{35}S- Ferredoxin wurde, wie unter C.III.a.3. beschrieben, dargestellt und analog zu C.II.3 abgebaut. Die Radioaktivität wurde berechnet, wie in C.V.b. erklärt. Praktisch die gesamte Radioaktivität wurde in der TPPS-Lösung gefunden (Tabelle 7c). Aus dem ^{35}S-TCA-Apoferredoxin wurde der restliche Schwefel-35 nach der gleichen Methode quantitativ abgespalten.

VI. Bestimmung der freien Cystein-Mercaptogruppen

a) durch Carboxymethylierung mit Jodessigsäure-2-^{14}C

Freie Cystein-Mercaptogruppen in Proteinen lassen sich nach Canfield und Anfinsen (22) mit Jodessigsäure quantitativ carboxymethylieren. Nach dieser Methode wurden natives Ferredoxin, DP-, TCA-, Tiron- und TPP-Apoferredoxin mit Jodessigsäure-2-^{14}C umgesetzt. Die verwendete Jodessigsäure-2-^{14}C wurde so verdünnt, daß $1{,}33.10^5$ dpm einem µMol entsprach. Die Flüssigkeitsszintillationsmessungen wurden entsprechend der Vorschrift in C.V.b. durchgeführt.

Aus 2,5 µMol Ferredoxin wurde analog zu C.II.b. TCA-Apoferredoxin dargestellt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Niederschlag in 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8,6 gelöst und unter Stickstoff im Dunkeln mit 250 µMol Jodessigsäure-2-^{14}C versetzt. Nach 15 Minuten wurde die Mischung auf eine Sephadex G-50-Säule (100 x 2,5 cm) aufgetragen und mit 0,2 M Acetat-Puffer pH 7,4 chromatographiert. Das nach ca. 200 ml eluierte ^{14}CMC-Apoferredoxin wurde lyophilisiert und an Sephadex G-25 (100 x 2,5 cm) entsalzt. Ausbeute nach der Gefriertrocknung: 1,58 µMol mit einer Gesamt-Radioaktivität von $4{,}24.10^5$ dpm. Das entspricht 1,75 freien Cystein-Mercaptogruppen pro Mol Protein.

Nach dem gleichen Verfahren wurden im DP-Apoferredoxin 2,0, im Tiron-Apoferredoxin 2,9 und im TPP-Apoferredoxin 4,7 Cystein-Mercaptogruppen pro Mol Protein bestimmt. Die Versuche wurden in 8 M Harnstoff wiederholt, um auch eventuelle durch die Tertiärstruktur des Proteins geschützte Cystein-Mercaptogruppen zu erfassen. Die Ergebnisse blieben aber die gleichen.

Im nativen Ferredoxin wurden mit dieser Methode 0,06 freie Cystein-Mercaptogruppen ermittelt. Bei der Bestimmung in 8 M Harnstoff denaturierte das Ferredoxin zu ca. 70 %. Im denaturierten Ferredoxin wurden 1,5 freie Cystein-Mercaptogruppen gefunden.

b) durch Aminosäureanalysen des CMC-Proteins

In einem Pyrex-Rohr wurden jeweils 1 bis 5 mg Protein mit 2 ml 6 N HCl versetzt und im Vakuum bei 110°C 24 Stunden hydrolysiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Citrat-Puffer aufgenommen und die Aminosäuren mit einem Beckman Unichrom Aminosäureanalysator bestimmt.

Aminosäure	DP-Apofd µMol	DP-Apofd AMR+)	Tiron-Apofd µMol	Tiron-Apofd AMR+)	denat. Fd µMol	denat. Fd AMR+)
CM-Cystein	0,084	1,8	0,163	2,9	0,000	0,0
Asparagin S.	0,610	13,0	0,725	12,8	0,902	12,9
Threonin	0,382	8,0	0,437	7,7	0,563	8,0
Serin	0,334	7,0	0,424	7,4	0,531	7,5
Glutamin S.	0,710	15,0	0,951	16,1	0,867	12,5
Prolin	0,224	4,7	0,297	5,2	0,300	4,3
Glycin	0,322	6,8	0,433	7,6	0,487	7,0
Alanin	0,439	9,2	0,512	9,0	0,629	9,0
1/2 Cystin	0,094	1,9	n.bb.		0,261	3,7
Valin	0,339	7,1	0,417	7,4	0,437	6,3
Methionin	0,021	0,4	n.bb.		0,026	0,4
Isoleucin	0,183	3,9	0,230	4,0	0,306	4,3
Leucin	0,370	7,8	0,480	8,4	0,539	7,8
Tyrosin	0,175	3,7	0,221	3,9	0,259	3,7
Phenylalanin	0,085	1,8	0,124	2,2	0,137	2,0

+) AMR = Aminosäurereste pro Mol Protein; n.bb. = nicht bestimmbar

c) durch PCMB-Titration

0,1 µMol PCMB wurden in 10 ml Meßkolben mit 0,002 - 0,05 µMol Ferredoxin versetzt. Nach 30 Minuten wurde mit Wasser aufgefüllt und die Extinktion bei 250 nm gemessen. Die Absorption des PCMB und des Ferredoxins wurden nachträglich berücksichtigt. Die sich ergebenden Geraden wurden durch Ausgleichsrechnung bestimmt und ihr Schnittpunkt berechnet. 7,7 SH-Gruppen wurden titriert, entsprechend 3,7 freien Cystein-Mercaptogruppen pro Mol Protein.

VII. Gleichzeitige Bestimmung von Eisen, "labilem Schwefel" und freien Cystein-Mercaptogruppen

a) bei der DP-Reaktion

2,88 µMol Ferredoxin wurden analog zu C.II.a. mit DP abgebaut. Der frei werdende Schwefelwasserstoff wurde mit Stickstoff in eine Mischung aus 80 ml 1 %-iger wässriger Zinkacetatlösung und 4 ml 12 %-iger NaOH in einem 250 ml Meßkolben übergetrieben. Das gebildete Zinksulfid wurde wie unter C.V.a. als Methylenblau bestimmt. Gefunden wurden 5,05 µMol S^{2-}, entsprechend 1,75 Mol pro Mol Protein.

Der Eisen(II)-Gehalt wurde aus der Extinktion der Reaktionslösung bei 525 nm bestimmt. Gefunden wurden 5,18 µMol Fe^{2+}, entsprechend 1,8 Mol Fe^{2+} pro Mol Protein.

Zur Bestimmung der freien Cystein-Mercaptogruppen wurde der pH der Reaktionsmischung mit Tris-HCl-Puffer auf 8,6 gebracht. Dann wurden 250 µMol Jodessigsäure-2-^{14}C zugegeben und die Reaktionsmischung nach dem Einengen durch Lyophilisieren, wie unter C.VI.a. beschrieben, weiter verarbeitet. Aus der Radioaktivität wurden 2,0 Mol freie Cystein-Mercaptogruppen durch Aminosäureanalyse 1,7 Mol pro Mol Protein bestimmt.

b) bei der TCA-Reaktion

2,5 µMol Ferredoxin wurden analog zu C.II.b. mit TCA abgebaut. Der Schwefelwasserstoff wurde wie oben bestimmt. Gefunden wurden 3,5 µMol S^{2-}, entsprechend 1,4 Mol S^{2-} pro Mol Protein.

Nach dem Zentrifugieren der Reaktionslösung wurde der Überstand mit 25 ml 0,5 %-iger DP-Lösung versetzt und in einem 250 ml Meßkolben mit 0,2 M NaOH auf pH 5,2 gebracht. Mit Wasser wurde auf 250 ml aufgefüllt. Aus der Extinktion bei 525 nm ergaben sich 4,75 µMol Fe^{2+}, entsprechend 1,9 Mol Fe^{2+} pro Mol Protein.

Der Niederschlag wurde in 10 ml 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8,6 gelöst. Die freien Cystein-Mercaptogruppen wurden wie vorher bestimmt. Gefunden wurden 1,75 Mol pro Mol Protein.

c) bei der Tiron-Reaktion

2,53 µMol Ferredoxin wurden, wie unter C.II.d. beschrieben, mit Tiron abgebaut. Nach 5 Stunden wurde der pH auf 3,5 eingestellt und der Schwefelwasserstoff innerhalb 4 Stunden mit Stickstoff übergetrieben und wie vorher bestimmt. Gefunden wurden 1,5 Mol pro Mol Protein. Nach dem Zentrifugieren wurde der Eisen(III)-Gehalt der Lösung aus der Extinktion bei 560 nm bestimmt. Gefunden wurden 4,40 µMol Fe^{3+}, entsprechend 1,7 Mol Fe^{3+} pro Mol Protein.

Die freien Cystein-Mercaptogruppen wurden wie bei der TCA-Reaktion bestimmt. Aus der Radioaktivität wurden 2,8 Mol pro Mol Protein berechnet, durch Aminosäureanalyse 2,9 Mol freie Cystein-Mercaptogruppen bestimmt.

d) bei der TPP-Reaktion

1,0 µMol Ferredoxin wurden analog zu C.II.e. abgebaut. Das organische Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und die Proteinlösung mit 25 ml DP-Lösung versetzt. Aus der Extinktion bei 525 nm wurden 1,2 Fe^{2+} g-Atome pro Mol Protein bestimmt (Der Rest des Eisens ist wahrscheinlich bei der Aufarbeitung zu Eisen(III) oxidiert). Die freien Mercaptogruppen wurden mit Jodessigsäure-2-^{14}C carboxymethyliert und durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Gefunden wurden 4,7 freie Cystein-Mercaptogruppen pro Mol Protein.

VIII. Enzymatische Bestimmung der Aktivität

Die Aktivitäten des nativen und des resynthetisierten Ferredoxins und die des DP-Apoferredoxins wurden im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen getestet. Gemessen wurden die photosynthetische NADP-Reduktion und die Sauerstoffproduktion. Jeder Ansatz enthielt:

5 µMol $MgCl_2$
10 µMol anorganisches Phosphat
10 µMol ADP
10 µMol Ascorbat
6 µMol NADP
"broken chloroplasts" mit 0,2 mg Chlorophyll

Die Gesamtlösung betrug 3 ml. Die Teste wurden in Tris-HCl-Puffer pH 8,0 durchgeführt. Nach 12 Minuten Belichtung mit 35 000 Lux bei 15°C unter Stickstoff ergaben sich folgende Werte:

natives Ferredoxin:

Probe in µMol	O in µg-Atomen	NADPH in µMol
0,0068	4,4	4,2
0,0068	4,0	4,3
0,0136	5,1	5,0

resynthetisiertes Ferredoxin:

Probe in µMol	O in µg-Atomen	NADPH in µMol
0,0076	4,2	4,5
0,0152	4,5	4,4
0,0304	5,0	5,0

DF-Apoferredoxin:

Probe in µMol	O in µg-Atomen	NADPH in µMol
0,050	0,0	0,0

D. Zusammenfassung

Ein neues Verfahren zur Isolierung des Ferredoxins aus Spinat wurde entwickelt. Nach fünf verschiedenen Verfahren - mit α,α'-Dipyridyl, Trichloressigsäure, p-Chlor-mercuribenzoat, Tiron und Triphenylphosphin - ließ sich das Aktivzentrum des Ferredoxins abbauen. Die drei Komponenten des Zentrums - Eisen, "labiler Schwefel" und Cystein-Mercaptogruppen - reagierten dabei aus verschiedenen Oxidationsstufen.

Aus dem DP-, TCA- und PCMB-Apoferredoxin ließ sich mit zwei Methoden Ferredoxin resynthetisieren, das in seinen Eigenschaften vom nativen Ferredoxin nicht unterscheidbar war.

Durch Einbau von Schwefel-35 in das TCA-Apoferredoxin und durch verschiedene Abbaureaktionen mit dem synthetisierten ^{35}S-Ferredoxin wurde bewiesen, daß der "labile Schwefel" nicht durch ß-Eliminierung aus den Cysteinresten des Proteins frei wird. Die Abbaureaktionen ergaben ferner, daß der "labile Schwefel" unter bestimmten Bedingungen quantitativ als S^{2-} oder S^{o} reagieren kann. Die Existenz der Zwischenstufe $^{-}S\text{-}S^{-}$ erscheint wahrscheinlich.

Das Eisen konnte quantitativ in den beiden Oxidationsstufen Fe(II) und Fe(III) nachgewiesen werden.

Durch Umsetzungen mit Jodessigsäure-2-^{14}C wurde ferner gezeigt, daß im nativen Ferredoxin keine freien Cystein-Mercaptogruppen vorliegen. In den Apoferredoxinen wurden jedoch - abhängig von dem Typ der Abbaureaktion - bis zu 5 Cystein-Mercaptogruppen gefunden.

Durch gleichzeitige Bestimmungen des Eisens, des "labilen Schwefels" und der Cystein-Mercaptogruppen bei den verschiedenen Abbaureaktionen wurde versucht, die Gesamtoxidationsstufe des Aktivzentrums zu ermitteln. Die analytischen Bestimmungen sprechen für ein valenzisomeres System mit der Gesamtoxidationsstufe -1. Eine sterische Struktur des Aktivzentrums, die diesen Ergebnissen entspricht, ist in Abb. 13 wiedergegeben. Auf Grund des großen analytischen Fehlers, der bei der

Simultanbestimmung an dem extrem sauerstoffempfindlichen Redoxsystem auftritt, ist aber die Oxidationsstufe 0 oder -2 nicht auszuschließen.

Literaturverzeichnis

1. Mortenson, L.E., R.C. Valentine und J.E. Carnahan, Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 448 (1962).

2. Bayer, E., H. Eckstein, H. Hagenmaier, D. Josef, J. Koch, P. Krauss, A. Röder und P. Schretzmann, Europ. J. Biochem. im Druck.

3. Bachofen, R. und D.I. Arnon, Biochim. Biophys. Acta 120, 259 (1966).

4. Sasaki, R.M. und H. Matsubara, Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 467 (1967).

5. Arnon, D.I. Science 149, 1460 (1965).

6. Bayer, E., D. Josef, P. Krauss, H. Hagenmaier, A. Röder und A. Trebst, Biochim. Biophys. Acta 143, 435 (1967).

7. Matsubara, H., R.M. Sasaki und R.K. Chain, J. Biol. Chem. 243, 1725 (1968).

8. Kimura, T., Structure and Bonding 5, 1 (1968)

9. Cushman, D.W., R.L. Tsai und I.C. Gunsalus, Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 577 (1967).

10. Fogo, J.K. und M. Popowsky, Anal. Chem. 21, 732 (1949).

11. Krauss, P., Zulassungsarbeit zum Staatsexamen, Tübingen 1967.

12. Josef, D., Diplomarbeit, Tübingen 1967.

13. San Pietro, A. und H.M. Lang, J. Biol. Chem. 231, 211 (1958).

14. Davenport, H.E. und R. Hill, Biochem. J. 74, 493 (1960).

15. Tagawa, K. und D.I. Arnon, Nature 195, 537 (1962).

16. Bendall, D.S., R.P.F. Gregory und R. Hill, Biochem. J. 88, 29 P (1963).

17. Tagawa, K. und D.I. Arnon, Biochim. Biophys. Acta 153, 602 (1968).

18. Fry, K.T. und A. San Pietro, in Photosynthetic Mechanisms of Green Plants, 252 (1963).

19. Bayer, E., W. Parr und B. Kazmaier, Arch. Pharmaz. 298, 196 (1964).

20. Hong, J. und J.C. Rabinowitz, Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 246 (1967).

21. Eckstein, H., Diplomarbeit, Tübingen 1968.

22. Canfield, R.E. und C.B. Anfinsen, J. Biol. Chem. 238, 268, 4 (1963).

23. Horio, T. und T. Yamashita, Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 142 (1962).

24. Fry, K.T. und A. San Pietro, Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 218 (1962).

25. Katoh, S. und A. Takamiya, Biochem. Biophys. Res.Commun. 8, 310 (1962).

26. Kathoh, S. und A. Takamiya, Arch. Biochem. Biophys. 102, 189 (1963).

27. Feigl, F. und H. Hamburg, Z. analyt. Chem. 86, 7 (1931).

28. Feigl, F., P. Krumholz und H. Hamburg, Z. analyt. Chem. 90, 199 (1932).

29. Evans, M.C.W., D.O. Hall, H. Bothe und F.R. Whatley, Biochem. J. 110, 485 (1968).

30. Beinert, H. und R.H. Sands, Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 34, 41, 47 (1960).

31. Palmer, G. und R.H. Sands, J. Biol. Chemistry 241, 253 (1966).

32. Hall, D.O., T.F. Gibson und F.R. Whatley, Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 81 (1966).

33. Röder, A. und E. Bayer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1335 (1967).

34. Shetna, Y.J., P.W. Wilton, R.E. Hansen und H. Beinert, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 52, 1263 (1964).

35. Palmer, G., Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 315 (1967).

36. Hollocher, T.C., F. Solomon und T.E. Ragland, J. Biol. Chemistry 241, 3452 (1966).

37. Der Vartanian, D.F., W.H. Orme-Johnson, R.E. Hansen, H. Beinert, R.L. Tsai, R.C.M. Tsibris, R.C. Bartholomaus und I.C. Gunsalus, Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 569 (1967).

38. Keresztes-Nagy, S. und E. Margoliash, J. Biol. Chemistry 241, 5955 (1966).

39. Bray, G.A., Anal. Biochem. 1, 279 (1960).

40. Brintzinger, H., G. Palmer und R.H. Sands, Proc.Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 397 (1966).

41. Fry, K.T., R.A. Lazzarini und A San Pietro, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 50, 652 (1963).

42. Fackler, J.P. und D. Coucouvanis, J.Am.Chem.Soc. 89, 1346, 1745 (1967).

43. Williams, D.H., R.S. Ward und R.G. Cooks, J.Am.Chem.Soc. 90, 966 (1968).

44. Kawamura, S., I. Itoh, T. Kitao, J. Tsurugi, Y. Shiba und S. Seno, Annu.Rep. Raddiat. Center Osaka Prefect. 8, 103 (1967).

45. Boyer, P.D., J. Am. Chem.Soc. 76, 4331 (1954).

46. Wei, C.H. und L.F. Dahl, Inorg. Chem. 4, 1 (1965).

47. Thewalt, U. und R. Marsh, J.Am.Chem. Soc. 89, 6364 (1967).

Review-Artikel und Bücher:

I) San Pietro, A. ed., Non-Heme Iron Proteins, Role in Energy Conversation, Antioch Press Yellow Springs 1965.

II) Buchanan, B.B., Structure and Bonding 1, 109 (1966).

III) San Pietro, A. und C.C. Black, Annual Review of Plant Physiology 16, 155 (1965).

IV) Malkin, R. und J.C. Rabinowitz, Annual Review of Biochemistry 36, 113 (1967).

Lebenslauf

Am 21. Oktober 1940 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Dr. Franz Josef und seiner Ehefrau Dr. Hanna Josef, geborene Kirberg, in Codlea / Rumänien geboren.

Im Herbst 1946 siedelte meine Familie nach Hilden bei Düsseldorf über. Nach vier Jahren Grundschule in Hilden trat ich am gleichen Ort in das naturwissenschaftliche Gymnasium ein. Dort legte ich im März 1961 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1961 begann ich in Tübingen das Chemiestudium. Die Diplom-Vorprüfung legte ich im Mai 1964, die Diplom-Hauptprüfung im November 1966 an der Universität Tübingen ab. Hieran schloß sich von November 1966 bis April 1967 die experimentelle Diplomarbeit und von April 1967 bis Februar 1969 die experimentelle Doktorarbeit an. Beide wurden unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. BAYER im Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meine akademische Ausbildung verdanke ich den Herren Professoren:

E. BAYER, K. BRODERSEN, W. BUES, G. KORTÜM, H. KRÜGER, H. MAUSER, G. MÖLLENSTEDT, Eu. MÜLLER, G. OPITZ, G. RIEK und W. RÜDORFF.

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen